

Über Phosphat- und Glycerinumsatz
der Phosphatide und ihre
Umsatzänderungen unter
verschiedenen Einflüssen

Wolfgang Oehler

1965



Über Phosphat- und Glycerinumsatz der Phosphatide und
ihre Umsatzänderungen unter verschiedenen Einflüssen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Wolfgang Oehler
aus
Bretten

August 1965

Berichterstatter : Professor Dr. L. H ö r h a m m e
Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.1965

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
E I N L E I T U N G u n d Z I E L S E T Z U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
A. Bisherige Arbeiten über den Phosphatumsatz der Phosphatide	2
B. Trenn- und Meßmethoden	8
I. Papierchromatographische Bestimmung radioaktiver Phosphate	8
1. Elution von Phosphatiden aus dem Chromatogramm	9
a) Extraktion aus Silikagelpapier	9
b) Extraktion aus Formaldehydpapier	10
2. Messen aus dem Papier	11
II. Ungenauigkeitsprüfung der Meßapparatur	12
1. Änderung der Impulshäufigkeit bei seitlicher Verschiebung des Präparats bei Geiger-Müller- Zählroren	13
2. Meßfehler beim Methandurchflußzähler	14
3. Diskussion	18
III. Versuche zur Simultanmessung von ^{32}P -Phosphat und ^{14}C -Glycerin	19
1. Geräteeinstellung	20
2. Quench	23
3. Einfluß der Lage der Flecke und der Anfärbe- mittel auf die Aktivitätsausbeute	24
4. Auswaschungen aus dem Chromatogrammfleck durch die Szintillatorflüssigkeit	26
C. Untersuchungen über den relativen Einbau von Glycerin und Phosphat in die Phosphatide. Simultanmessung der beiden Isotope ^{32}P und ^{14}C	27
1. Bisherige Arbeiten	27
2. Ergebnisse des ^{14}C -Glycerin und ^{32}P -Phosphat- einbaus	29
3. Diskussion	31
4. Verhältnis von ^{32}P zu ^{14}C -Aktivitäten	35

D. Untersuchungen über den ^{32}P -Phosphatumsatz der Phosphatide bei verschiedener Phosphat-Applikation	38
1. Ergebnisse	39
2. Diskussion	40
E. Vergleich der spez. Aktivitäten bei steigender Phosphatkonzentration der Injektionslösung	42
1. Ergebnisse und Diskussion	45
F. Abhängigkeit des ^{32}P -Phosphateinbaus vom Alter und Gewicht der Versuchstiere	47
1. Bisherige Arbeiten	47
2. Eigene Untersuchungen	48
3. Diskussion	50
G. Einfluß von γ -Strahlen auf den Phosphateinbau in die Phosphatide	51
1. Bisherige Arbeiten	51
2. Eigene Arbeiten	52
3. Diskussion	59
EXPERIMENTELLER TEIL	62
A. Durchführung der Extraktion	62
1. Lyophilisieren und Pulverisieren	62
2. Extraktion	62
B. Quantitative Phosphatidbestimmung	62
1. Papierchromatographische Auftrennung	62
2. Anfärbereagenzien	63
3. Quantitative Phosphorbestimmung	64
C. Radioaktive Markierung von Phosphatiden	65
1. Markierung bei in vivo Versuchen	65
2. Markierung bei in vitro Versuchen	65
3. Doppelmarkierung mit ^{32}P -Phosphat und ^{14}C -Glycerin	65
4. Umrechnung auf Gewichtseinheit	67
5. Verhältnis von ^{32}P -Phosphat und ^{14}C -Glycerin	68
D. γ -Bestrahlung der Versuchstiere	69

E. Messen der Aktivitäten	70
1. Geiger-Müller-Zählrohre	70
2. Methandurchflußzähler	70
3. Tri-carb-Flüssigspektrometer	70
4. Ermittlung des Wirkungsgrades	71
5. Aktivitätsausbeuten der Geiger-Müller-Rohre und des Methandurchflußzählers	72
6. ^{32}P -Anteil im ^{14}C -Kanal	73
7. ^{32}P -Zerfallsreihe	74
8. Berechnung der spez. Aktivitäten	75



E I N L E I T U N G u n d Z I E L S E T Z U N G

Aus Umsatzsteigerungen der Phosphatidsäure und der Inositphosphatide nach Acetylcholin-Stimulierung schlossen HOKIN und HOKIN¹⁾ auf eine Funktion der Phosphatidsäure und der Inositphosphatide. Sie vermuteten, daß diese beiden Phosphatide beim Kationentransport durch die Zellmembran eine Rolle spielen.

Abweichungen im Phosphatidumsatz lassen sich jedoch nicht nur durch Änderung der physiologischen Verhältnisse, sondern ebenso durch Änderung von Versuchsbedingungen oder durch äußere Einflüsse erzielen.

Die vorliegende Arbeit untersucht daher den Einfluß von Faktoren, wie Alter und Gewicht der Versuchstiere, steigende Konzentration der Injektionslösung, verschiedene Applikationsformen für Phosphat oder Ganzkörperbestrahlung, auf den Phosphatidumsatz.

Zur genaueren Festlegung des Phosphatidumsatzes führten wir zwei Isotope in das Phosphatidmolekül ein, aus deren relativem Einbau wir auf die de-novo Synthese von Phosphatiden schlossen. Im Gegensatz zu HOKIN²⁾ und BROCKERHOFF³⁾ konnten wir beide Isotope gleichzeitig messen und waren somit von Parallelversuchen unabhängig.

Um die äußeren Einflüsse auf den Phosphatidumsatz richtig beurteilen zu können, haben wir ferner die gebräuchlichsten papierchromatographischen Trennverfahren und verschiedene Detektoren auf ihre Brauchbarkeit untersucht. Eingehende Studien über die Durchführung einer Simultanmessung mit einem Flüssigspektrometer haben wir als Voruntersuchung beigelegt.

A. Bisherige Arbeiten über den Phosphatumsatz von Phosphatiden

Untersuchungen über die Stoffwechselfunktionen der Phospholipide waren lange Zeit undurchführbar, da die geeigneten Trenn- und Analysenmethoden fehlten. Die Aufmerksamkeit richtete sich auf diese Stoffgruppe erst, als Wege gefunden wurden, selbst kleinste Mengen komplexen Phospholipidgemisches zu trennen und zu analysieren. Zu der anfänglichen Fällungsmethode⁴⁾ und zur Trennung durch Aluminiumoxyd⁵⁾⁶⁾ oder Kie-
selsäure-Säulen⁵⁾⁷⁾⁸⁾ waren größere Ausgangsmengen notwendig. Erst die papier-⁶⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾ und dünn-schichtchromatographischen Methoden¹³⁾¹⁴⁾ für teilweise hydrolysierte¹⁵⁾ oder intakte Phosphatide brachten eine vollständige Auftrennung und ebneten somit den Weg für eine intensive Phosphatidforschung. Der wesentlichste Grund für die Intensivierung der Phospholipidforschung war die inzwischen erkannte biochemische Bedeutung der Lipoproteine:

Die Zellmembranen sind reich an Phospholipiden. Ebenso enthalten die Mitochondrien zu etwa 20 - 30% Phospholipide. Hier sollen die Phosphatide den Elektronentransport bewirken¹⁶⁾. Eine weitere Funktion der Phosphatide vermutet HOKIN¹⁾. Er ordnet den Phosphatiden, nach seinen Untersuchungen mit der Salzdrüse des Albatros, eine Funktion beim Kationentransport durch die Zellmembran zu.

Ferner verdienen die Phospholipide Beachtung, da sie sogenannte "essentielle Fettsäuren" enthalten, die den Cholesterinspiegel im Blut regulieren.

Die Funktionsuntersuchungen der Phosphatide wurden fast ausschließlich durch Einbau von ^{32}P -Phosphat, in selteneren Fällen durch Einbau von ^{14}C - oder ^3H -Verbindungen durchgeführt¹⁷⁾. Bei ^{32}P -Markierung wird nur der Phosphatrest der Lipide markiert, während z.B. mit ^{14}C - oder ^3H -Acetat sowohl die Fettsäuren, das Glycerin als auch der Phosphatrest markiert sein können. Ferner sind die ^{32}P -Aktivitäten mit den gebräuchlichen Meßvorrichtungen genauer zu erfassen, als ^{14}C - oder ^3H -Aktivitäten.

Über den E i n b a u von ^{32}P -Phosphat in die Phospholipide verschiedener Organe liegen zahlreiche Arbeiten vor: CHAIKOFF und ZILVERSMIT¹⁸⁾ untersuchten die ^{32}P -Aufnahme in Gewebe und Gesamtextrakten: Nach Verabreichung von ^{32}P -Phosphat dringt das Phosphat besonders rasch in die Zellen der Leber, der Darmschleimhaut und der Niere ein. Gehirn, Muskelzellen und Erythrocyten nehmen Phosphat nur langsam auf. In der Leber, Darmschleimhaut und Niere wird das Phosphat besonders zur Synthese von Phosphatiden herangezogen¹⁸⁾. Nach 36 Std. z.B. wird in der Leber 10.3% ^{32}P je g Phosphatid-P, in die Niere 7.3% und in den Dünndarm 9.5% eingebaut. Demgegenüber liegen die Werte im Gehirn bei 0.1% und in den Muskeln bei 0.3%.

OSAMU MINARI¹⁹⁾ untersuchte die Aufnahme von ^{32}P -Phosphat in die einzelnen Lipide und Gewebe von Ratten. Gewisse Zeitintervalle (6,12,24,192-312 Std.) nach intraperitonealer Injektion wurde in den Organen der Gehalt an Gesamtpospholipiden festgestellt. Die Verfassen fanden folgende Reihe: Milz > Leber > Lunge > Gehirn > Blutplasma. Die Radioaktivitätsfolge der Phosphatide war: Leber > Lunge > Milz > Gehirn > Blutplasma. In weiteren Untersuchungen stellten dieselben Autoren²⁰⁾ den Einfluß fettreicher Kost bzw. Cholinmangel auf die ^{32}P -Phosphataufnahme fest: bei fettreich ernährten Tieren geht weniger Phosphat in die Phospholipide über als bei normal ernährten Tieren. Hinsichtlich des Phosphatübergangs in die Phospholipide unter dem Einfluß von Diätformen sind die Unterschiede der einzelnen Gewebe unbedeutend²¹⁾.

Den zeitlichen Phosphateinbau in die Rattenleberphosphatide beobachtete DAWSON²²⁾ in vivo. Die Phosphatide PÄ, PC und MPI fand DAWSON 7 - 9 Std. nach der Injektion am höchsten markiert. Die spez. Aktivität von PS jedoch, erreichte erst nach 13 Std. ihren höchsten Wert.

Ähnliche Ergebnisse erzielte MARINETTI²³⁾ für PÄ, PC und PS. Sm baute Phosphat sogar noch etwas langsamer ein als PS.

Erläuterung der Abkürzungen:

PÄ	=	Phosphatidyläthanolamin
PC	=	Phosphatidylcholin
MPI	=	Monophosphoinositid
DPI	=	Diphosphoinositid
PS	=	Phosphatidylserin
SM	=	Sphingomyelin
CL	=	Cardiolipin

Über die Einbaugeschwindigkeit des Phosphats in die einzelnen Phosphatide der Leber berichtet ebenfalls SAKAGAWA²⁴⁾.

30 Min. nach intraperitonealer Injektion von ^{32}P -Phosphat befand sich die höchste spez. Aktivität in der DPI-Fraktion. Die spez. Aktivität von PS und PÄ betrug $\frac{3}{4}$ davon, die von PC $\frac{1}{6}$. Nach 12 Std. bestanden nur noch geringe Unterschiede.

WIEDEMANN²⁵⁾ verfolgte den Einbau von ^{32}P -Phosphat in verschiedene Organe mit besonderer Berücksichtigung des DPI-Komplexes. Er fand für die Inositphosphatide aller untersuchter Organe, mit Ausnahme der Leber, nach 4 und 8 Std. Einbauzeit die höchsten spez. Aktivitäten. WIEDEMANN konnte mit seinen Ergebnissen die Vermutung von KENNEDY blegen, daß der Biosyntheseweg der Inositphosphatide abweichend von dem der N-haltigen Phosphatide verläuft.

MARINETTI und Mitarb.²⁶⁾ studierten den ^{32}P -Phosphateinbau in vivo in 15 Phosphatide verschiedener Organe. In allen Organen waren PC, PA und die Inositphosphatide am höchsten markiert. Die spez. Aktivitäten im Hirn bezeichnete er als zu niedrig, um sie mit einem G-M Zähler erfassen zu können. Die spez. Aktivitäten der Leber (1110), Niere (938), Lunge (618), Herz (321) und Milz (618) wurden angegeben.

Über die in Niere und Hirn eingebaute ^{32}P -Phosphatmenge gibt uns eine Arbeit von D'AMBRAMO und Mitarb.²⁷⁾ Auskunft. Beim Einbau in die Phospholipide der Niere waren nur 2 - 3% in das Hirn nur 1% des eingesetzten Phosphats beteiligt. Der weit größere Teil wurde in α -Glycerophosphat, Adenylpolyphosphat, Triosephosphat und Hexosephosphat eingebaut.

Das G e h i r n ist bezüglich des Phosphatidumsatzes das meist untersuchte Gewebe des Körpers:

DZIEWATKOWSKI und BODIAN²⁸⁾ und DAWSON und RICHTER²⁹⁾ stellten übereinstimmend einen langsamen Übergang anorg.Phosphats vom Blut in das Mäusehirn fest. Der Gehalt im Hirn bleibt dann allerdings länger erhalten, als im Blut. ANSELL und SPANNER³⁰⁾ zeigten anschließend, daß PC und PÄ nach 24 Std. dieselbe spez. Aktivität hatten, wie das anorg.Phosphat des Hirns. In früheren Untersuchungen konnte ANSELL und SPANNER³¹⁾ nach 3 Std. für das Hirn-Kephalin junger Tiere nur 70% der spez. Aktivität des anorg.Phosphats finden, während PC schon nach 3 Std. diese Aktivität erreicht hatte.

MIANI und BUCCIANTE³²⁾ fanden bei 6 Tagen alten Tieren das Maximum des Phosphateinbaus in PC und PÄ des Hirns erst nach 40 Std.

WAGNER und Mitarb.³³⁾ fanden 32 Std. nach ³²P-Gabe ein Verhältnis der spez. Aktivitäten im Rattenhirn: PS:(PC und PÄ): MPI:DPI₁:DPI₂ = 1:2:4:6:8. Die Höhe der spez. Aktivitäten beliefen sich bei Injektion von 330 µC/100 g Ratte nach 32 Std. auf: PC und PÄ 128, PS 59, MPI 268, DPI₁ 380 und DPI₂ 455.

Die Beziehungen zwischen dem Übertritt des Phosphats vom Blut zum Hirn und dem Phosphateinbau in die Phospholipide des Hirns 16 Tage alter Ratten untersuchte DAVISON und Mitarb.³⁴⁾. Obwohl der Übertritt des Phosphats vom Blut zum Hirn langsam vor sich ging, war dieser Übergang doch noch schneller, als der Einbau des Phosphats in die Phospholipide. Diese Ergebnisse zeigten, daß der Stoffwechsel der Hirnphosphatide selbst, nicht ein zu geringes Angebot an markiertem Phosphat die Ursache des niedrigen Einbaus ist. Im Widerspruch hierzu stehen die Untersuchungen von YBEMA³⁵⁾, der 24 Std. nach intracisternaler Injektion von ³²P-Phosphat 30% der injizierten Menge in den Lipiden wiederfand.

Die Abhängigkeit des Phospholipidumsatzes vom A l t e r der Tiere zeigte CORNATZER und REITER³⁶⁾ an der M ä u s e l e b e r . Sie berechneten das Verhältnis der spez. Aktivitäten

der Phospholipide zu der spez. Aktivität des anorg. Phosphats. Die so errechnete relative Aktivität fällt bei PC, PA, SM und den Inositphosphatiden während der ersten 17 Lebenstage ab. Zwischen dem 17. und 840. Tag tritt keine Änderung ein. Der Gesamtphospholipidgehalt steigt während der ersten 60 Tage an und bleibt dann konstant. In mehreren Arbeiten wird von dem höheren Umsatz der Gesamthirnp^hosphatide jüngerer Tiere gegenüber älteren berichtet³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾. Eine Erklärung könnte darin zu suchen sein, daß im Hirn älterer Tiere ein Teil der Phospholipide stoffwechsel-inaktiv ist. Bei der Bestimmung der spez. Aktivitäten werden diese inaktiven Phosphatide jedoch mitbestimmt und erniedrigen somit den Umsatzwert. Eine andere Erklärung wäre, daß die Phospholipide jüngerer Tiere mehr radioaktives Phosphat⁴⁰⁾ und ebenso Acetat⁴¹⁾ einbauen, als Hirnschnitte älterer Tiere. Anscheinend verlieren gewisse Zellen im Alter ihre Fähigkeit, Phospholipide zu synthetisieren oder das Enzymsystem wird im Alter funktionsuntüchtiger. LAATSCH⁴²⁾ z.B. fand während der Myelinationsperiode der Ratten einen erhöhten Enzymspiegel von Glycerophosphatdehydrogenase, der im Alter absank.

Zur Wirkung von Ganzkörperbestrahlung auf den Phospholipidstoffwechsel von Tieren finden wir verschiedene Arbeiten: Die Autoren aller Arbeiten unterwerfen die Tiere einer 400 - 600 r X-Bestrahlung.

KUNTA und Mitarb.⁴³⁾ fanden nach dieser Bestrahlungsdosis einen um den Faktor 4 erhöhten Phosphatgehalt in den Muskelzellen. Demgegenüber sind die spez. Aktivitäten von ATP und CTP erniedrigt⁴⁴⁾.

Auch Phosphatidbausteine, wie z.B. die Fettsäuren, erfahren durch Ganzkörperbestrahlung eine Veränderung:

Die Fettsäuren zeigen 6 Tage nach der Bestrahlung eine Erhöhung, die nach 15 Tagen wieder zurückgebildet ist. Hierbei haben gesättigte und ungesättigte Fettsäuren einen recht unterschiedlichen Stoffwechsel⁴⁵⁾. Den ungesättigten Fettsäuren widmete sich OHARA⁴⁶⁾. Er fand nach gaschromatographischer Bestimmung

ein Abfallen der C-18 und höher ungesättigten Fettsäuren zugunsten der C-16 Fettsäuren. Summarisch konnte er jedoch einen Rückgang der ungesättigten Fettsäuren von Phospholipiden zugunsten der Lysophosphatide feststellen. Meßergebnisse von SKALKA⁴⁷⁾ lassen erkennen, daß die strahleninduzierte Zunahme des Leberfettgehaltes mit einer Abnahme der Erythrozytenzahl korrespondiert. Die heftige Anaemie und der damit verbundene Sauerstoffmangel haben schwere Leberschäden zufolge.

Selbst Auswirkungen auf den Phosphatidstoffwechsel sind nach Ganzkörperbestrahlung bekannt.

JARDETZKY und Mitarb.⁴⁸⁾ fanden eine signifikante Erhöhung der spez. Aktivitäten der Gesamtphosphatide. Auch Arbeiten von SKALKA⁴⁹⁾ und WRBA⁵⁰⁾ weisen auf eine Erhöhung des Phosphatidumsatzes hin.

Die genannten Arbeiten beziehen sich jedoch nur auf die Gesamtphosphatide. Entsprechend dem Anteil der einzelnen Phosphatide an den Gesamtphosphatiden, werden eventuelle Abweichungen der in geringerer Konzentration vorkommenden Phosphatide, nur unbedeutende Änderungen des Ergebnisses bewirken. Wir untersuchten daher die einzelnen Phosphatide in verschiedenen Organen.

Durch Einwirkung von Strahlen auf Zellen wird vermutlich nur die Durchlässigkeit der Zellen für anorganisches Phosphat erhöht, so daß in den Organen lediglich eine Umsatzsteigerung durch erhöhtes Phosphatangebot auftritt. Es würde sich somit um eine Phosphatkonzentrationssteigerung handeln.

Parallel zu einer indirekten Phosphatsteigerung untersuchten wir die Auswirkungen variabler Phosphatinjektionen auf den Umsatz der Phosphatide.

Voraussetzungen, selbst geringe Abweichungen im Phosphatidumsatz erkennen zu können, sind exakte Trenn- und Meßmethoden.

Wir stellten daher eine kritische Betrachtung über papierchromatographische Trennverfahren und die Genauigkeit von Detektoren an den Anfang unserer Ausführungen.

Trenn- und Meßmethoden

I. Papierchromatographische Bestimmung radioaktiver Phosphatide

Zur Auftrennung von Lipoidextrakten hat sich die Papierchromatographie als sehr geeignet erwiesen. Neben der Papierchromatographie wurden noch zwei weitere, grundlegende Trennverfahren für Phosphatide erarbeitet.

Durch teilweise, alkalische Hydrolyse konnte DAWSON¹⁵⁾ Lipide deacylieren. Er erhielt wasserlösliche, Glycerinphosphathaltige Ester, die papierchromatographisch getrennt wurden. Dieses Verfahren ist unspezifisch, da Bausteine gebildet werden, die nicht eindeutig einem Phosphatid zugeordnet werden können.

Die zweite Möglichkeit führt über die Säulenchromatographie. Die Lipoidextrakte werden durch Aluminiumoxyd⁵⁾⁶⁾ oder Kieselsäure-Säulen⁵⁾⁷⁾⁸⁾ in Fraktionen aufgetrennt. Das Verfahren eignet sich nur zur Trennung von Phospholipiden in Gruppen.

Zur Papierchromatographischen Auftrennung in t a k t e r Phosphatide wurden verschiedene Methoden entwickelt: HECHT⁵¹⁾, HACK⁵²⁾, MARINETTI⁵³⁾ und WITTER⁵⁴⁾ versuchten die Trennung von Phosphatiden auf nicht imprägniertem Filterpapier. Gewisse Erfolge erzielten auch INOUE und NODA⁵⁵⁾ auf Tetralin-imprägniertem Papier, während DIECKERT¹⁰⁾, BROWN⁵⁶⁾ und MULDER¹²⁾ verschiedene Phosphatide auf Kieselsäure-imprägniertem Glasfieberpapier trennen konnten. ROUSER⁵⁷⁾ versuchte die Chromatographie von Phosphatiden auf Phosphat-getränktem Papier. All diese Methoden eignen sich zur Trennung einzelner Phosphatide, nicht aber eines Gesamtextraktes. Nach Prüfung der Trenneigenschaften blieben zwei für unsere Zwecke geeignete Papiere übrig:

1. Das von LEA⁶⁾, ROUSER⁵⁷⁾ und CORMIER⁵⁸⁾ benutzte und von MARINETTI⁵⁹⁾ weiterentwickelte Silikagelpapier.

2. Das mit Formalin imprägnierte Papier von HÖRHAMMER¹¹⁾.
Mit diesem Papier konnten wir Lipoidextrakte in zwei Richtungen vollständig auftrennen.

1. Elution von Phosphatiden aus dem Chromatogramm

Zunächst stellten wir Versuche an, inwieweit die von MARINETTI⁵⁹⁾ entwickelte Methode, Phosphatide nach chromatographischer Trennung durch Elution zu erhalten, auf unsere Problemstellung zu übertragen sei. Besonderen Wert legten wir auf die Elution der Inositphosphatide.

a) Extraktion aus Silikagelpapier

Wir trennten einen mit ³²P markierten Leberphosphatidextrakt auf Silikagelpapier auf und extrahierten die ausgestanzten Phosphatidflecken nach MARINETTI⁵⁹⁾ mit einer in methanolischen HCL-Lösung 60 Minuten bei 60 - 70°.

T a b e l l e 1

Elution der Phosphatide aus Silikagelpapier

Phosphatid	Aktivität	Imp./Min.			
		15 Min.	30 Min.	60.Min.	% Rückstand nach 60 Min.
Lecithin	5700	1149	757	450	7.9
Kephalin	4875	787	549	383	7.8
Phosphatidylserin	1311	423	336	237	18.0
Monophospho- inositid	1193	746	444	277	23.2
Diphospho- inositid	871	436	374	278	31.9

Laufmittel: Diisobutylketon/Eisessig/Wasser (40:20:3)

Lösungsmittel: Methanolische HCL (1n)

Während Lecithin und Kephalin (Tab.1) mit 92% noch gut aus dem Papier eluiert werden konnten, bleiben etwa 20% vom Phosphatidylserin und Monophosphoinositid im Papier zurück. Das Diphosphoinositid ließ sich selbst nach 60 Min. Extraktion nur zu 70% aus dem Silikagelpapier entfernen.

Durch die unterschiedlichen Elutionswerte ist diese Methode für quantitative Bestimmungen ungeeignet.

b) Extraktion aus Formaldehydpapier

Als Vergleich zu den Extraktionsausbeuten aus dem Silikagelpapier, führten wir dieselben Versuche beim Formaldehydpapier durch. Die Elutionswerte zeigen, ob alle Phosphatide gleichermaßen aus dem Papier zu lösen sind.

T a b e l l e 2

Extraktion der Phosphatide aus Formaldehydpapier

Phosphatid	Aktivität	Imp./Min.		
		30 Min.	60 Min.	% Rückstand nach 60 Min.
Lecithin/ Kephalin I	17540	1020	815	4.6
Phosphatidyl- serin I	587	153	41	6.9
II	571	148	53	9.2
Monophospho- inositid I	699	52	37	5.2
II	619	63	50	8.0
Diphospho- inositid I	335	278	201	60.0
II	349	288	220	63.0
III	320	215	173	54.0

Laufmittel: Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) aufsteigend

Lösungsmittel: I = in methan.HCL

II = Methanol

III = Chloroform/Wasser/Äthanol (8:0.25:2) kochen

Unsere Untersuchungen ergaben (Tab.2) bei der Elution von Monophosphoinositid aus Formaldehydpapier, sowohl mit reinem Methanol, als auch mit dem von MARINETTI⁵⁹⁾ verwendeten Lösungsmittel in methanolische HCL, eine Extraktion von 90 - 95%. Demgegenüber erwies sich die Adsorption des Diphosphoinositids an das Formaldehydpapier so stark, daß selbst beim Kochen mit Chloroform/Äthanol/Wasser (8:2:0.25) nur etwa 40 - 50% dieses Inositphosphatids eluiert werden konnte.

2. Messung aus dem Papier

Zunächst erhob sich die Frage, ob bei direkter Messung aus den beiden Papieren eine Aktivitätseinbuse zu verzeichnen ist.

Hierzu trennten wir gleiche Mengen eines Leberextraktes sowohl auf Silikagel-, als auch auf Formaldehydpapier chromatographisch auf. Nach Anfärben mit Rhodamin-B- bzw. Nilblaulösung schnitten wir die Flecken aus und bestimmten die Aktivitäten.

T a b e l l e 3

Messung von Aktivitäten aus Formaldehyd- bzw. Silikagel-papier

Phosphatid	Imp./Min.		
	Formaldehyd-papier	Silikagel-papier	Abweich. %
Lecithin	1161	1127	97
Kephalin	853	822	96
Monophospho-inositid	234	217	93
Diphospho-inositid	308	298	97
Phosphatidylserin	198	211	106

Laufmittel: Formaldehydpapier: { Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5)
 Silikagelpapier: { Tetrahydrofuran/Diisobutylketon/
 Diisobutylketon/Eisessig/ Wasser (45:5:6)
 Wasser (40:20:3)

aufsteigend - Meßgerät: Methandurchflußzähler - Imp.Vorwahl: 10⁴Imp.

Aus Tab. 3 ist ersichtlich, daß nach Auftragen gleicher Phosphatidmengen sowohl bei Formaldehydpapier als auch bei Silikagelpapier nahezu dieselben Aktivitäten gemessen wurden. Es ist daraus zu schließen; trotz längerer Laufstrecke beim Formaldehydpapier (zwei Richtungen), wird kein Phosphatid zurückgehalten. Die Abweichungen liegen nur wenig über dem statistischen Fehler.

Nachdem sich die beiden Papiersorten bezüglich der Auftrennung der Phospholipide und Messung der Aktivitäten ebenbürtig sind, sollte ein weiteres Kriterium über das geeignete Papier entscheiden:

Mit dem Formalinpapier kann man durch eine spezifische Veraschungsmethode nach WAGNER⁶⁰⁾ den Phosphorgehalt der Phosphatide bestimmen, ohne zuvor die Phosphatide aus dem Papier eluiert zu haben. Dieser Vorteil gab den Ausschlag zu Gunsten des Formalinpapiers.

II. Ungenauigkeitsprüfung der Meßapparatur

Für unsere Messungen war es notwendig, neben kleinen, punktförmigen Flecken, auch größere Phosphatidflecken noch genau messen zu können. Geringe Unterschiede im Ergebnis sollten aus geänderten Versuchsbedingungen, nicht aber aus Meßungenauigkeiten resultieren.

Die in der Fachliteratur beschriebenen physikalischen Fehlermöglichkeiten sollen nicht untersucht werden. Unsere Messungen beziehen sich lediglich auf Fehlerquellen, die von der Geometrie des Präparats zur Meßanordnung abhängig sind.

Messungen mit einem ^{32}P -Testpräparat ergaben für den Methandurchflußzähler 29% Ausbeute. Mit den in unserem Laboratorium verwendeten Geiger-Müller Zählrohren (565/1 und 592/1 Telefunken) konnten wir 18% bzw. 22% der Zerfälle erfassen.

1. Änderung der Impulshäufigkeit bei seitlicher Verschiebung des Präparats bei G-M Zählrohren

Auf einem vorgezeichneten Grundriß der beiden G-M Zähler wurde auf dem Durchmesser ein Maßstab in mm vom Mittelpunkt aus gezeichnet. Hierauf wurde ein etwa 1 mm $\varnothing$ grosser radioaktiver Punkt nach außen bewegt und die Zählleistung der Rohre geprüft.

T a b e l l e 4

Aktivitäten gemessen in veränderlichem Abstand zum Mittelpunkt der Zählrohre

Abstand v. Mittelpunkt cm	I Imp./Min.	% Abfall	II Imp./Min.	% Abfall
M	1123		1696	
0.1	1115	0.8	1644	2.9
0.2	1084	3.5	1605	5.3
0.3	1089	3.1	1644	3.0
0.4	1051	6.5	1666	1.7
0.5	1053	6.3	1668	1.6
0.6	1008	10.3	1652	2.5
0.7	933	17.0	1660	2.1
0.8	835	25.7	1691	0.2
0.9	759	32.5	1630	3.8
1.0	699	37.8	1704	0.0
1.5	-	-	1514	10.7

Aktivitätsquelle: P^{32} aktiver Punkt $\varnothing$ 1 mm

gemessene Impulse 10^5 Imp.

450 V, 2,2 Schwelle, 400 Verst., Totzeit $2 \cdot 10^{-3}$

Geiger-Müller-Zählrohre: Telefunken

I - MS MG 565/1 (2.2 cm $\varnothing$)

II - MS MG 592/1 (3.0 cm $\varnothing$)

Beim Geiger-Müller-Zählrohr MS GM 565/1 ($\varnothing$ 2.2 cm) ist bei einem Mittelpunktsabstand von 0.6 cm schon ein Aktivitätsabfall von 10% wahrzunehmen. Der Durchmesser der zu messenden radioaktiven Flecken darf für dieses Geiger-Müller-Rohr 1.2 cm nicht übersteigen, um eine Fehlergrenze von 10% nicht zu erreichen.

Demgegenüber geht aus den Messungen mit dem Geiger-Müller-Zähler MS GM 592/1 ($\varnothing$ 3.0 cm) hervor, daß im Abstand von 1.0 cm vom Mittelpunkt noch kein Aktivitätsabfall festgestellt werden kann und im Abstand von 1.5 cm mit einem 10.7%igen Verlust gerechnet werden muß. Mit diesem Detektor können Flecken bis zu einem Durchmesser von 2.5 cm noch genau gemessen werden.

2. Meßfehler beim Methandurchflußzähler

In ein Meßschälchen, mit einem Durchmesser von 5 cm, wurde ein Fadenkreuz eingezeichnet, mit mm-Maßstab versehen. Senkrecht und parallel zur Meßschleife schoben wir einen 1 mm $\varnothing$ radioaktiven Punkt vom Mittelpunkt nach außen und ermittelten die Impulse.

T a b e l l e 5

Impulshäufigkeit in Abhängigkeit vom Mittelpunktsabstand beim
Methandurchflußzähler

Abstand v. Mittelpunkt cm	parallel z. Draht	% Abfall	senkrecht Draht	% Abfall
M	2480		2480	
0.2	2485	0	2495	0
0.5	2482	0	2441	1.6
0.7	2445	1.5	2396	3.4
0.8	2448	1.3	2336	5.9
0.9	2455	1.1	2224	10.4
1.0	2433	1.9	1962	20.9
1.2	2368	4.6	1687	32.0
1.5	2245	9.5	1570	37.0
1.7	2104	15.2	1504	39.4
2.0	1923	22.5	1438	42.1
2.3	1745	29.7	1402	43.5
2.5	1708	31.2	1427	42.5

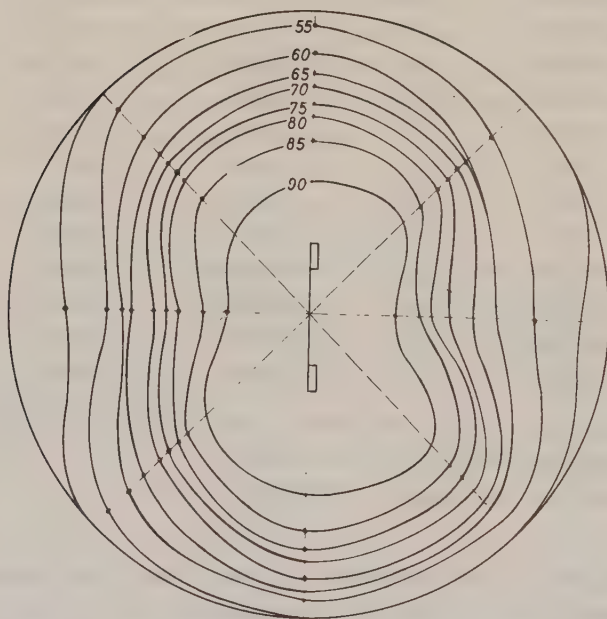
Methandurchflußzähler MS MD 632/1 Telefunken

2800 V, 2,2 Schwelle, 400 Verst., Totzeit $2 \cdot 10^{-3}$

Tab. 5 zeigt die Empfindlichkeitsverteilung des Methan-
durchflußzählers bei 2.8 kV in Abhängigkeit von der Lage
der Präparate. Es ist daraus ersichtlich, daß die Meßbe-
dingungen parallel und senkrecht zur Meßschleife sehr
unterschiedlich sind.

Bei Messungen parallel zum Draht kann man im Abstand von
2 cm einen Abfall von 22.5% wahrnehmen, während bei 1 cm
Abstand die Aktivität nur 1.9% unter der Mittelpunktsmes-
sung liegt.

Weit größer ist die Empfindlichkeitsabnahme des Detektors bei Messungen senkrecht zur Zähl Schleife. Die 10%ige Grenze erreichen wir bei einem Mittelpunktsabstand von 0.9 cm, während der Aktivitätsabfall bei 2 cm schon 42.1% beträgt. Abb. 1 stellt eine Auswertung unserer Messungen dar und gibt in Form einer Draufsicht die Empfindlichkeit an einzelnen Stellen eines Präparateschälchens wieder (5.0 cm $\varnothing$).



Maßstab
2 : 1

Abb. 1

Empfindlichkeitsverteilung beim Methandurchflußzähler

Die Zahlen geben die prozentual Ausbeute für Punkte an, die vom Mittelpunkt weiter entfernt liegen.

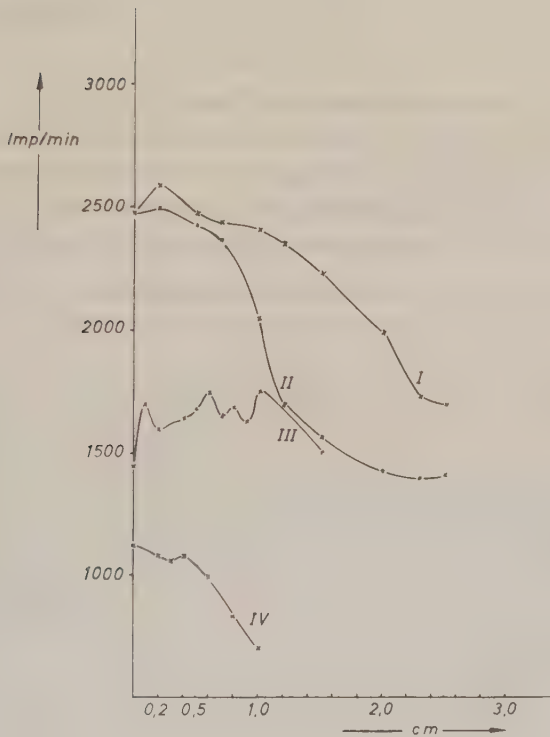


Abb. 2

Empfindlichkeit verschiedener Detektoren abhängig von der Lage der Präparate

- I = Methandurchflußzähler parallel zur Schleife
- II = Methandurchflußzähler senkrecht zur Schleife
- III = G-M Zähler MS MG 592/1
- IV = G-M Zähler MS MG 565/1

Aktivitätsquelle: P^{32} aktiver Punkt 1 mm ϕ
 gem. Impulse 10^5 Imp.

Diskussion

In Abb. 2 sind die Meßausbeuten verschiedener Detektoren veranschaulicht. Sie zeigen zweierlei Ergebnisse:

1. Aus dem Abfall der Kurven kann man den Rückgang der Meßgenauigkeit der einzelnen Detektoren ansehen. Bei absoluten Messungen sind diese Erkenntnisse besonders zu berücksichtigen. Bei Relativmessungen hingegen ist darauf zu achten, in allen Versuchen dieselben Bedingungen einzuhalten.
2. Die Impulse des Methandurchflußzählers und der Geiger-Müller-Zählrohre sind mit demselben Strahler ermittelt worden. Die Aktivitäten am Mittelpunkt spiegeln somit das Verhältnis der Meßausbeuten der verschiedenen Detektoren wieder. Die Bedeutung dieser Untersuchungen für die Papierchromatographie wird offensichtlich, wenn man bedenkt, daß die chromatographisch aufgetrennten Phosphatide nicht auf einer kleinen Fläche im Mittelpunkt zentralisiert sind. Die Phosphatide können gleichmäßig über den ganzen Fleck verteilt sein oder größere Konzentrationen liegen an irgend einer Stelle des ausgeschnittenen Chromatogrammflecks.

III. Versuche zur Simultanmessung von ^{32}P -Phosphat und ^{14}C -Glycerin

Seit der Herstellung des ersten brauchbaren Flüssigspektrometers durch F.N.HAYES⁶¹⁾ und R.D.HIEBERT, R.J.WATTS⁶²⁾ von den Los Alamos-Laboratorien, hat sich die Flüssigszintillationszählung zu einer vielgebrauchten Methode für schwache Strahler entwickelt. Dieses Verfahren findet zur Messung von α -, β - und γ -Strahlen Verwendung.

Das Messen mit glüssigen Szintillatoren bietet folgende Vorteile:

1. Ein so niederenergetischer Strahler, wie z.B. C^{14} , kann gegenüber dem Methandurchflußzähler mit dreifacher Ausbeute gemessen werden.
2. Die ungewöhnliche Vielseitigkeit des Zählers erlaubt das Messen von Proben in flüssiger und fester Form, als auch das Messen von Aktivitäten aus dem Chromatogrammpapier.
3. Wegen der linearen Impulsverstärkung der Zählordnung ist die Möglichkeit gegeben, zwei Strahler verschiedener Energie durch Impulshöhenanalyse (Discriminatoren) nebeneinander in einer Probe zu messen. Ein Problem, das mit dem Methandurchflußzähler und mit den Geiger-Müller-Zählern nicht zu lösen ist.
4. Im Gegensatz zu den Geiger-Müller-Zählrohren bleibt die Meßausbeute unabhängig von der Geometrie der Aktivität zur Zählordnung. Durch die 4π -Geometrie des Szintillationszählers, als auch durch das Fehlen von Selbstabsorptionseffekten, sind besonders günstige Verhältnisse geschaffen. Das Isotop ^{14}C z.B. wird mit 60 - 80% Ausbeute gemessen.
5. Durch den hohen Wirkungsgrad des Flüssigszintillators haben wir die Möglichkeit, noch schwache Aktivitäten zu

messen. Wir können somit bei in vivo Versuchen mit geringen Mengen radioaktiver Substanz arbeiten. Das erleichtert besonders den Strahlenschutz.

1. Geräteeinstellung

Seitdem Flüssigspektrometer zur Messung von Aktivitäten verwendet werden, beschäftigt man sich auch mit dem Messen von Aktivitäten direkt aus dem Papier⁶³⁾⁶⁴⁾⁶⁵⁾. Selbst Berichte über Messungen von zwei Isotopen liegen vor. ROCHE, NUNEZ und JACQUEMIN⁶⁶⁾ waren unter den Ersten, die das Problem der Simultanmessung lösten. Sie trugen mit ^3H als auch mit ^{131}J markierte Jodverbindungen auf Papier auf. Die Tritiumaktivität wurde mit einem Flüssigspektrometer gemessen, während die Aktivität des ^{131}J mit einem Geiger-Müller-Zähler ermittelt wurde.

Eine Simultanmessung im eigentlichen Sinne wird von LUDWICK⁶⁷⁾ beschrieben. Ihm gelang das gleichzeitige Messen von ^{95}Zr und ^{95}Nb mit denselben Ausbeuten, wie bei der Einzelmessung.

Unsere Aufgabe war es, die zur Simultanmessung der beiden Isotope ^{14}C (0.158 Mev) und ^{32}P (1.71 Mev) günstigste Geräteeinstellung zu finden. Die von den beiden Isotopen ausgesandten Energien verhalten sich wie 1:14. Durch Begrenzen des Meßbereichs (Discriminatoren) und Verstärken der Energien (Gain) können wir zwei Isotope nebeneinander messen.

Bei der ^{32}P - M e s s u n g wird der Gain niedrig gehalten. Die natürliche Energiedifferenz der ^{32}P und ^{14}C -Quanten reicht aus, die ^{32}P -Impulse quantitativ im Meßbereich A-B zu erfassen. Die ^{14}C -Impulse hingegen erreichen die von den Discriminatoren gesetzten Grenzen nicht; sie werden ausgeschlossen.

Werden bei der ^{14}C - M e s s u n g die ausgesandten Quanten beider Isotope noch mehr verstärkt, so wird die Energie-

differenz dieser beiden so groß, daß die ^{32}P -Quanten den ^{14}C -Kanal zu 90% überschreiten. Da die Spektren aller Isotope jedoch bei Null beginnen (Abb. 3, S.23), kann bei der ^{14}C -Messung ein Teil der ^{32}P -Impulse nicht ausgeschlossen werden. Durch Vorversuche mit einem ^{32}P -Präparat läßt sich der Prozentsatz der in den ^{14}C -Kanal fallenden ^{32}P -Impulse ermitteln. Diese Rate wird von dem ^{14}C -Ergebnis subtrahiert.

Durch eine Reihe von Vorversuchen mit reinen ^{14}C - und ^{32}P -Präparaten konnten wir die für unsere Anforderungen idealste Einstellung finden. Tabelle 6 zeigt einen Ausschnitt der wichtigsten Ergebnisse, die als Grundlage für die Geräteeinstellung dienen.

T a b e l l e 6

Meßausbeuten von ^{14}C und ^{32}P in Abhängigkeit von Discriminatoren und Gain

		Gain			
		Imp./Min.			
Isotop	Discriminat.	1.5%	1.8%	1.0%	2.5%
^{32}P	150-1000	7392	7594	5888	5804
	200-1000	6930	7176	4909	7159
	220-1000	6540	7393	4314	7547
	300-1000	5062	5400	2781	5745
^{14}C	150-1000	9	26	11	49
	200-1000	12	15	8	15
	220-1000	12	12	7	10
	300-1000	11	10	5	5
		13%	20%	25%	30%
^{14}C	70-300	934	726	586	457
	70-400	1171	942	801	666
	70-450	1256	1055	893	766
^{32}P	70-300	504	344	256	213
	70-400	661	458	373	301
	70-450	774	538	418	359

Die Messungen wurden mit ^{32}P - und ^{14}C -Testpräparaten durchgeführt.

Meßgerät: Tricarb Flüssigspektrometer der Fa. PACKARD, Illinois
3000 Series

Ergebnisse

Da das Spektrum aller Strahler bei Null beginnt, kann zwar der höherenergetische ^{32}P allein gemessen werden, doch werden bei der ^{14}C -Messung immer ^{32}P -Impulse mitgezählt.

Aus Tabelle 6, S. 21, ergibt sich bei 1.8% Gain für ^{32}P die größte Zählrate. Es fallen bei einer Discriminatorenstellung von 220 - 1000 12 Imp./Min. in den ^{14}C -Kanal, gegenüber dem ^{32}P -Kanal mit 7393 Imp./Min.. Ein weiteres Öffnen des ^{32}P -Kanals auf A=150 - 1000 ergäbe zwar noch mehr Impulse, doch würde ein 2.7%iger Anstieg der ^{32}P -Impulse ein 116%iges Anwachsen der ^{14}C -Impulse zur Folge haben.

Eine Erniedrigung des Gains auf 1% würde hingegen die ^{32}P -Impulsausbeute von 7393 auf 4314 Imp./Min. herabsetzen, jedoch lediglich eine Verminderung der ^{14}C -Impulsrate im ^{32}P -Kanal von 12 auf 7 Imp./Min. bewirken.

Eine weitere Möglichkeit wäre, den Gain zu erniedrigen und gleichzeitig den Kanal zu öffnen. Durch Öffnen des Kanals von 220 auf 150 und Erniedrigung des Gains auf 1% steigt zwar die Ausbeute von 4314 auf 5888 Imp./Min., doch bleibt der Wert noch unter der Ausbeute von 7393 Imp./Min. bei 1.8% und A=220 Discriminatorenstellung. Bei der ^{14}C -Messung verstärkt ein Gain von 20% die ^{32}P -Impulse so stark, daß sie bei einer Discriminatorenstellung von 70 - 400 zu 90% außerhalb des ^{14}C -Kanals liegen und nicht mehr erfaßt werden. Das ^{14}C -Spektrum liegt bei dieser Verstärkung vollständig innerhalb des Meßbereichs. Die Impulse können somit quantitativ erfaßt werden.

Durch Messen mit ^{14}C und ^{32}P -Präparaten ergab sich ein ^{32}P -Anteil innerhalb des ^{14}C -Kanals von 10%. Durch Subtraktion von 10% der ^{32}P -Impulse vom ^{14}C -Meßwert erhalten wir die ^{14}C -Impulse.

Nach vorangegangenen Überlegungen entnehmen wir aus Tabelle 6, S. 21, eine Geräteeinstellung von:

A-B	^{32}P -Kanal	1.8% Gain, 220-1000 Discriminatoren
C-D	^{32}P -Quench	1.8% Gain, 680-1000 Discriminatoren
E-F	^{14}C -Kanal	20% Gain 70-400 Discriminatoren

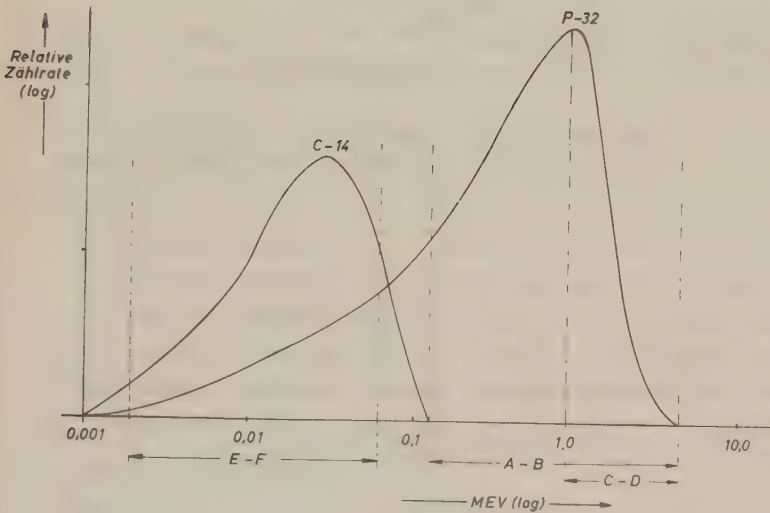


Abb. 3

Energiespektren von ^{32}P und ^{14}C

Discriminatoren (A-B, C-D, E-F)

2. Quench

Da es sich beim Flüssigszintillator um einen Spektrometer handelt, ist das Meßergebnis von der gemessenen Lichtenergie abhängig. Verschiedene Substanzen, die unter dem Begriff Löscher (Quencher) zusammengefaßt werden, stören den Szintillationsprozeß, da sie wegen ihrer Eigenfarbe Licht absorbieren oder weil sie Energie absorbieren, ehe diese auf den Szintillator übertragen wird. Diesen höchst unerwünschten Löscheffekt kann man auf verschiedene Weise begegnen:

1. durch Änderung der Instrumenteneinstellung⁶⁸⁾
2. durch Verwenden innerer Standards⁶⁹⁾
3. durch Extrapolationsmethoden⁷⁰⁾
4. durch Beobachten der Verschiebung des Spektrums⁷¹⁾

Wir wählten die letztere Methode, da sie durch das Dreikanalsystem des Tricarb-Meßgeräts bei jedem Meßvorgang durchzuführen ist.

Der Quencheffekt reduziert nicht nur das Spektrum eines Isotops, sondern verschiebt es auch nach einer Seite⁷²⁾, so daß das Spektrum außerhalb der Discriminatorenengrenzen zu liegen kommt. Ein Vergleich der Quotienten, die aus den Meßwerten des ganzen Spektrums (Abb.3, A-B) und einem kleinen Ausschnitt desselben (C-D) gebildet werden, zeigt dann einen Quench an, wenn sich die Quotienten ändern.

3. Einfluß der Lage der Flecke und der Anfärbemittel auf die Aktivitätsausbeute

WANG und JONES⁷³⁾ fanden eine Lichtabsorption des Papiers um 30%. Dieser Wert bleibt allerdings für denselben Strahler konstant und kann bei den hohen Ausbeuten von ^{32}P und ^{14}C in Kauf genommen werden. Unabhängig bleibt demgegenüber die Zählausbeute von der Papiersorte⁷⁴⁾.

Wir untersuchten den Einfluß verschiedener Faktoren auf das Meßresultat, wie Lage der Flecken zur Meßanordnung oder Größe des Quenches durch Anfärbemittel.

Einen papierchromatographisch aufgetrennten Lipoidextrakt färbten wir mit Nilblau, Rhodamin B oder Ninhydrin an. Die so lokalisierten Phosphatide schnitten wir aus dem Chromatogramm und gaben die Flecken in die Szintillatorflüssigkeit. Die Flecken fixierten wir einmal senkrecht und einmal parallel zum Zählfenster des "Photomultipliers" und ermittelten die Aktivität.

Tabelle 7 zeigt einen Überblick über den Aktivitätsabfall bei den genannten Einflüssen.

T a b e l l e 7

Einfluß der Lage der Flecke und der Anfärbemittel auf die
Meßausbeute

Nr.	Imp./Min.		% Abfall d. Lage
	senkrecht	parallel	
1	9570		
2	8990 (6.4)	8949	0.46
3	6169 (36.2)	6102	1.08
4	9034 (9.2)	8886	1.63

(...) = % Abfall durch Anfärben, bezogen auf Nr. 1
Imp. Vorwahl 10^5 Imp.

senkrecht bzw. parallel zum Zählfenster

- 1 = radioaktives Phosphatid auf Formaldehydpapier
- 2 = Phosphatid auf FH-Papier mit Nilblau angefärbt
- 3 = Phosphatid auf FH-Papier mit Rhodamin B angefärbt
- 4 = Phosphatid auf FH-Papier mit Ninhydrin angefärbt

Der Aktivitätsabfall, der durch die Lage des Fleckens verursacht wird (Tabelle 7) ist so gering, daß er die Fehlergrenze des statistischen Fehlers nicht überschreitet. Die Abweichungen hingegen, die durch die Anfärbemittel verursacht werden, sind beträchtlich. Der Meßunterschied bei Nilblau bzw. Ninhydrin beträgt 6 bzw. 9% gegenüber ungefärbten Chromatogrammstellen. Diese Werte sind unabhängig von der Farbintensität.

Da der Quench bei allen Versuchen gleich groß ist, kann dieser Faktor bei vergleichenden Untersuchungen unberücksichtigt bleiben.

Demgegenüber zeigt Rhodamin B einen 36%igen Meßabfall. Dieser Quench schwankt bei verschieden stark gefärbten

Flecken. Es wäre notwendig, den Auswaschungsgrad des An-färbemittels konstant zu halten.

Der hohe Quench von Rhodamin B hat seine Ursache darin, daß der Farbstoff wegen seiner Eigenfarbe Licht absorbiert und somit den Szintillationsprozeß stört. Im Gegensatz zu Nilblau, dessen Absorptionsmaximum bei 6400 Å liegt⁷⁵⁾, reicht der Absorptionsbereich von Rhodamin B (Maximum 5100-5460 Å⁷⁶⁾) bis zu 4300 Å, der für den Meßvorgang des Tri-carb idealen Wellenlänge.

4. Auswaschungen aus dem Chromatogrammfleck durch die Szintillatorflüssigkeit

Da die Phosphatidflecken nach dem Messen zur Phosphatbestimmung herangezogen werden sollen, ist zu prüfen, ob durch die Szintillatorflüssigkeit Phosphatide ausgewaschen werden. Wir ließen Phosphatidflecken 1 Std. bzw. 4 Std. in Toluol stehen und schüttelten verschiedene Proben über 30 Minuten. Nachdem die Flecken aus der Flüssigkeit entfernt waren, konnten wir die ausgewaschenen Aktivitäten messen (Tab. 8).

T a b e l l e 8

Elution von Phosphatiden aus dem Chromatogrammfleck durch die
Szintillatorflüssigkeit

Ges.Aktivität	Imp./Min.					
	ausgewaschen		ausgewaschen		ausgewaschen	
	I	%	II	%	III	%
8949	53	0.59	50	0.55	69	0.77
18566	64	0.34	103	0.55	120	0.64
6102	54	0.88	39	0.64	59	0.96
8686	131	1.51	121	1.39	119	1.37

I = nach 1 Std. Stehen

II = nach 4 Std. Stehen

III = nach 0.5 Std. Schütteln

Blindwert 16 Imp./Min.

Nach dem Entfernen der Chromatogrammflecken aus dem Szintillator blieben weniger als 1% der Aktivitäten zurück. Zwei Gründe lassen sich für diese Ergebnisse anführen. Eine erhöhte Adsorption angefärbter Phosphatide an das Papier und eine Verkleisterung der Phosphatide, die nach einigem Stehen eintritt.

C. Untersuchungen über den relativen Einbau von Glycerin und Phosphat in die Phosphatide. Simultanmessung der beiden Isotope ^{32}P und ^{14}C

1. Bisherige Arbeiten

Da die Phosphatide einen hohen Umsatz haben, müssen sie an Reaktionen beteiligt sein, bei denen Phosphor übertragen wird oder bei denen Phosphatide Trägerfunktionen haben. Wie schon eingangs erwähnt, weisen HOKIN und HOKIN¹⁾ auf eine solche Funktion der Phosphatide hin: Der Na-Transport durch die Lipoproteinmembran soll an die Erneuerung des Phosphats in lipotroteingebundenen Phosphatiden gekoppelt sein.

Würde jedoch nur Phosphat im Stoffwechsel eine Rolle spielen, so müßten die übrigen Bestandteile, wie Glycerin und die Fettsäuren, erhalten bleiben, zumal nach der Meinung verschiedener Autoren⁷⁷⁾⁷⁸⁾ das für die de-novo Synthese von Phosphatiden benötigte Glycerin durch enzymatische Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat gebildet wird, das seinerseits bei der Glykolyse entsteht⁷⁹⁾.

Die Frage nach dem Phosphat- und Glycerinumsatz der Phosphatide läßt sich jedoch nur durch Einführen zweier radioaktiver Isotope klären.

Markierungen mit zwei Isotopen werden in der Literatur zwar beschrieben, doch finden wir in keinem Fall eine Simultanmessung beider Isotope. Man umgeht dieses Problem auf verschiedene Weise:

HOKIN und HOKIN¹⁾ verwenden in ihren Untersuchungen ^{14}C -Glycerin, ^{32}P -Phosphat und ^3H -Inosit. Eine Arbeit beschäftigt sich mit der Proteinsekretion in Pankreasschnitten⁸⁰⁾, eine weitere mit dem Austausch von Inosit und Phosphat in Gehirnpheosphoinositid²⁾. Beide in-vitro-Arbeiten versuchen zu klären, welchen Einfluß Acetylcholin auf den Einbau der drei markierten Verbindungen hat. Alle Untersuchungen werden jedoch in Parallelversuchen mit je einer markierten Substanz durchgeführt. Besondere Beachtung verdient die Aufarbeitung und Bestimmung der Aktivitäten:

Die ^{32}P -markierten Phosphatide konnte HOKIN direkt aus dem Papier messen. Die ^{14}C - und ^3H -markierten Lipotide wurden nach Elution aus dem Papier und Einengen der Extraktionsflüssigkeit mit einem Geiger-Müller-Zählrohrs gemessen. Das Ergebnis mußte mit einem Elutionsfaktor korrigiert werden: HOKIN unterwarf die ^{32}P -markierten Phosphatide derselben Elutionsprozedur, wie die ^{14}C - und ^3H -Aktivitäten und errechnete den Faktor aus den ^{32}P -Meßwerten vor und nach der Extraktion. HOKIN räumt bei dieser Bestimmungsmethode eine Schwankungsbreite von 10% ein, die bei DPI und Pts sogar noch größer ist.

Auch BROCKERHOFF und BALLOU³⁾ nahmen ihre in vitro-Einbaustudien in getrennten Versuchen vor. Sie inkubierten Kaninchenhirnschnitte mit ^3H -Myoinositol und mit ^{14}C -Glycerin und bestimmten die markierten Inositphosphatide. Aus einem Ansteigen der Aktivitäten von Mono- zum Di- und Triphosphoinositid schlossen diese Autoren auf eine sukzessive Phosphorylierung. Indem sie beide Einbaustudien unter genau denselben Bedingungen durchführten, konnten sie die Werte miteinander vergleichen. Das Messen der ^{14}C - und ^3H -Aktivitäten geschah analog zu der von HOKIN verwendeten Methode.

Eine gleichzeitige Markierung mit den Isotopen ^{14}C und ^{32}P nahm ALTMANN und Mitarb.⁸¹⁾ vor. Durch das unterschiedliche Energieniveau dieser Isotope, konnten sie die Aktivitäten durch Differenzberechnung ermitteln. Sie deckten das Meßgut mit einer dünnen Aluminiumfolie ab. Die energiereicheren ^{32}P -Strahlen durchdrangen größtenteils das Filter und konnten mit einem Zählror erfaßt werden. Auch diese Messungen sind ohne Korrekturfaktoren nicht durchführbar, da ein Teil der ^{32}P -Quanten durch das Filter zurückgehalten wird.

Diesen Untersuchungen ist gemeinsam, daß sie in vitro mit Organen eines Tieres durchgeführt wurden. Bei in vitro Versuchen besteht jedoch die Möglichkeit, daß durch Schädigung des Enzymsystems eine Ansammlung einer Biosynthesestufe auftritt⁸²⁾, oder daß durch geänderte Permeabilitätsverhältnisse gegenüber Phosphat oder Glycerin die Ergebnisse beeinflußt werden⁸³⁾.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die beiden Isotope in dasselbe Tier injiziert, so daß der relative Einbau von Phosphat und Glycerin von physiologischen Schwankungen lebender Versuchstiere oder Geweben unabhängig war.

Ein weiterer Vorteil gegenüber den vorgenannten Arbeiten ist das gleichzeitige Messen beider Isotope. Somit könnten Ungenauigkeiten, wie sie bei der Versuchsanordnung von HOKIN auftreten, ausgeschaltet werden.

Durch Doppelmarkierung und Simultanmessung ist es uns ferner möglich, die Frage der Phosphorylierung der Inositolphosphatide näher zu beleuchten.

2. Ergebnisse des ^{14}C -Glycerin- und ^{32}P -Phosphateinbaus

Ratten von 180 g Körpergewicht erhielten 125 μC ^{32}P -Phosphat und 100 μC ^{14}C -Glycerin subcutan gespritzt. Nach 24 Std. Inkubationszeit wurden die Tiere durch Ausbluten getötet, Hirn, Leber, Milz, Lunge, Niere und Herz entnommen

und lyophilisiert. Die getrockneten Organe wurden pulverisiert und mit Äther extrahiert. Nach chromatographischer Auftrennung aliquoter Teile des Ätherextraktes, wurden die Phosphatidflecken durch Anfärben mit Nilblaulösung lokalisiert. Das Ausmessen der Radioaktivitäten erfolgte mit einem Flüssigszintillationszähler der Fa. PACKARD. Die quantitative Phosphatbestimmung wurde photometrisch nach Versaschen der Flecken durchgeführt.

Um Einblick in die Größenverhältnisse des ^{32}P -Phosphat-Einbaus im Verhältnis zum ^{14}C -Glycerineinbau der verschiedenen Organe zu erhalten, haben wir zunächst in Tab. 9 die Impulse pro Minute, auf Imp./Min./g Organ umgerechnet, zusammengestellt.

T a b e l l e 9

Imp./Min./g Organ nach in vivo Einbau von ^{14}C -Glycerin und ^{32}P -Phosphat

Imp./Min./g Organ										
Organ	Isotop	MPI	DPI	TPI	PS	PC	PÄ	CL	SM	Ppts
Leber	^{32}P	37778	1612		23192	216450	186836	9724	21476	6630
	^{14}C	19006	936		11752	8918	26052	2132	0	6240
Hirn	^{32}P	18240	2850	2280	13110	74784	89718	4788	3534	
	^{14}C	17556	7752	8550	16644	48450	46854	6840	0	
Herz	^{32}P	1924	2072		2294	28046	44992	3996	1924	
	^{14}C	5550	5402		4292	9398	17020	6364	0	
Lunge	^{32}P	15651	25530		21090	209790	105894	4107		
	^{14}C	7959	8325		9657	52947	17538	3996		
Milz	^{32}P	14600	13900		4600	13400	2270	5300		
	^{14}C	5400	5000		3100	4100	6200	4700		
Niere	^{32}P	8140	7920		4664	31768	16456	2948	7876	
	^{14}C	3124	2948		3564	6116	5192	2816	0	

Simultanmessung mit Flüssigspektrometer der Fa. PACKARD

Ausbeuten: ^{32}P - 80%

^{14}C - 40%

125 μC ^{32}P -Phosphat und 100 μC ^{14}C -Glycerin pro 180 g Gewicht

Während die Imp./Min./g Organ lediglich eine Vergleichsmöglichkeit innerhalb eines jeden Organs bieten, lassen die spez. Aktivitäten die Gegenüberstellung der einzelnen Organe zu. Die ^{32}P - und ^{14}C -spez. Aktivitäten beziehen sich auf γ P, bei DPI wurden die ^{14}C -spez. Aktivitäten auf 2 γ Phosphor, bei TPI auf 3 γ P bezogen. Da CL 2 Mol Glycerin und 3 Mol P enthält, wurde hier auf 1.5 γ P bezogen.

T a b e l l e 10

Spez. Aktivitäten nach in vivo Einbau von ^{14}C -Glycerin und ^{32}P -Phosphat

Organ	Isotop	Spez. Aktivität (Imp./Min./ γ P)								
		MPI	DPI	TPI	PS	PC	PÄ	CL	SM	Ppts
Leber	^{32}P	672	775		719	1189	981	322	794	772
	^{14}C	338	225		364	134	136	46	-	727
Hirn	^{32}P	110	191	225	25	53	47	21	39	
	^{14}C	106	225	295	31	34	24	20	-	
Herz	^{32}P	896	700		124	233	187	93	325	
	^{14}C	258	91		232	78	70	98	-	
Lunge	^{32}P	282	547		452	649	418	231		
	^{14}C	138	69		207	163	69	150		
Milz	^{32}P	394	868		383	406	366	215		
	^{14}C	145	156		258	124	100	124		
Niere	^{32}P	880	830		530	481	268	173	483	
	^{14}C	338	151		405	92	256	112	-	

Die spez. Aktivitäten sind errechnet aus den Werten von Tab. 9, S.30, bezogen auf den entsprechenden P-Wert.

3. Diskussion

In Tab. 9 fallen die hohen Impulszahlen der Leberphosphatide auf. Diese Erhöhung gegenüber den übrigen Organen läßt sich bei allen Phosphatiden verfolgen. Es ist ein Hinweis auf den hohen Stoffwechsel der Leber⁸⁴⁾. Schon 1958 ordnete MINARI¹⁹⁾ die Organe von Ratten nach der Ein-

bauhöhe von anorganischen Phosphat in die Gesamtlipide. Er postulierte eine Reihe, die von der Leber über Niere, Lunge, Milz, Herz zum Hirn reicht. Demgegenüber rangiert die Leber in der Reihe, die nach dem Gesamtphosphorgehalt geordnet ist, nach der Lunge, Milz und Niere erst an vierter Stelle.

Auffallend hoch sind die Aktivitäten der Lunge. Dieses Organ hat nach der Leber die höchsten Impulszahlen pro g Organ. Da das anorganische Phosphat schon nach kurzer Zeit in der Lunge sein Maximum erreicht⁸⁵⁾, ferner festgestellt wurde, daß durch den Einfluß von Bestrahlung nach einer Stunde eine Erhöhung der Atmung eintritt⁸⁶⁾, kann ein erhöhter Einbau davon abgeleitet werden. Bei Untersuchungen über die Beteiligung der Lunge am Fettstoffwechsel, konnte SCHRADE und Mitarb.⁸⁷⁾ ebenfalls eine gesteigerte Phosphatidsynthese beobachten.

Aus Tabelle 10, S.31, (s p e z . A k t i v i t ä t e n) geht hervor, daß der Phosphatumsatz in der Leber am höchsten, im Gehirn am niedrigsten ist. Abweichendes Verhalten zeigen die ¹⁴C-spez.Aktivitäten. Während der Phosphatumsatz der N-haltigen Phosphatide PC und PA die höchsten spez.Aktivitäten aufweist, ist der Glycerinumsatz dieser beiden relativ niedrig. Diese Tendenz ist durch alle Organe hindurch zu verfolgen: Lecithin und Kephalin haben den höchsten Phosphatumsatz eines jeden Organs. Der Glycerineinbau dieser beiden N-haltigen Phosphatide hingegen liegt unter den Werten der übrigen Phosphatide.

Leber

Die spez.Aktivitäten der Leber liegen sowohl für die Phosphat- als auch für die Glycerinwerte über dem Umsatz der übrigen Organe. Lediglich die Glycerinwerte der Niere zeigen dieselbe Höhe oder übersteigen wie im Falle von PS oder CL den Umsatz der Leber.

Das MPI und DPI der Leber hat ^{32}P -spez. Aktivitäten von 672 bzw. 775. Sie liegen somit unter den Werten von PC, PÄ, SM und PPTs. Vergleicht man den Phosphatumsatz der Inositphosphatide mit dem anderer Organe, so stehen deren spez. Aktivitäten denen von Niere und Herz nahe.

Der Glycerinumsatz der Leberinositphosphatide zeigt ein umgekehrtes Bild: die Einbauraten von Glycerin in MPI und DPI übersteigen die übrigen Organe.

Hirn

Die Hirnphosphatide zeigen in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten⁸⁵⁾ den niedrigsten Phosphatumsatz aller Organe. Die spez. Aktivitäten der Hirninositphosphatide sind dagegen bezüglich des Phosphat- als auch des Glycerineinbaus 3-4 mal höher, als die der restlichen Phosphatide.

Die Inositphosphatide waren schon mehrfach Gegenstand eingehender Untersuchungen:

WAGNER, LISSAU, HÖLZL und HÖRHAMMER⁸⁸⁾ fanden nach in vivo-Einbau von ^{32}P -Phosphat im Rattenhirn DPI_1 und DPI_2 am höchsten markiert, gefolgt von MPI.

Die Untersuchungen von ELLIS und HAWTHORNE⁸⁹⁾ wurden ebenfalls in vivo an Kaninchen durchgeführt. Nach den Ergebnissen dieser Autoren steigt die spez. Aktivität der drei Inositphosphatide in der Reihenfolge vom Mono- zum Di- und Triphosphoinositid.

Ähnliche Ergebnisse beobachtete BROCKERHOFF und BALLOU⁹⁰⁾ bei in vitro Versuchen. Sie inkubierten Kaninchenhirnschnitte mit ^{32}P -Phosphat, wobei sie eine hohe Aktivität der beiden freien Phosphatestergruppen von Di- und Triphosphoinositid fanden, währenddessen die Phosphatidylgruppe des MPI weniger aktiv war.

In Tabelle 11 sind die Werte der besprochenen Arbeiten mit unseren Ergebnissen aufgeführt.

T a b e l l e 11

Spez. Aktivitäten von Hirninositphosphatiden

I.phosphatid	WAGNER ⁸⁸⁾	HAWTHORNE ⁸⁹⁾	BROCKERHOFF ⁹⁰⁾	eig. Unters.	
	sp. Akt.	Imp./mg P	sp. Akt.	sp. Akt.	
				³² P	¹⁴ C
MPI	268	54	73500	110	106
DPI	380	202	194000	191	225
TPI	455	306	213000	225	295

Auf Grund der steigenden ³²P-spez. Aktivitäten wäre auch aus unseren Ergebnissen eine stufenweise Phosphorylierung der Inositphosphatide zu folgern. Doch passen die ebenfalls steigenden ¹⁴C-spez. Aktivitäten nicht in das Bild einer sukzessiven Phosphorylierung des MPI. Vielmehr zeigen unsere Ergebnisse auf einen der beiden von ROSSITER⁹¹⁾ gezeigten Wege hin (Abb. 4):

Aus Glycerin wird über die Phosphatidsäure Diglycerid gebildet, das dann durch CDP über CDP-Diglycerid zu L- α -Glycerinphosphat überführt wird⁹²⁾.

Das Inosit seinerseits wird durch ATP zu Inositmono- bzw. -diphosphat phosphoryliert.

Das L- α -Glycerophosphat reagiert nun in Anwesenheit von Enzymen entweder mit freiem Inosit zu MPI⁹³⁾ oder mit Inositmono- bzw. -diphosphat zu DPI bzw. TPI. Das würde bedeuten, daß nicht aus MPI durch stufenweise Phosphorylierung DPI oder TPI entsteht, sondern aus Inosit durch sukzessive Phosphorylierung Inositmono- bzw. -diphosphat, das dann mit dem L- α -Glycerophosphat reagiert (siehe Abb. 4).

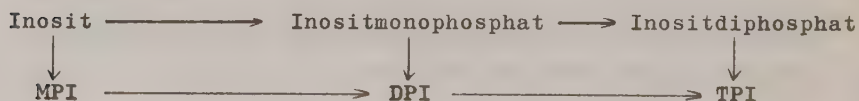


Abb. 4

Phosphorylierungsschema der Inositphosphatide
nach ROSSITER⁹¹⁾

Lunge, Milz, Niere

Die drei Organe Lunge, Milz und Niere weisen in der Höhe der spez. Aktivitäten nach der Leber den höchsten Phosphatidumsatz auf. Da sie ein nahezu einheitliches Verhalten zeigen, sollen sie zusammen besprochen werden.

Bei Lunge und Milz übersteigt der DPI-Umsatz für beide Isotope denjenigen von MPI, während der Einbau in beide Niereninositphosphatide gleichgroß ist.

Lecithin hat gegenüber Kephalin einen gesteigerten Umsatz. Der Glycerineinbau von PC und PA weist die niedrigsten Werte auf. Selbst der Glycerinumsatz von PS und CL übertrifft mit Werten um 200 den Einbau dieser N-haltigen Phosphatide.

DAWSON⁹⁴⁾ konnte nachweisen, daß beim hydrolytischen Phosphatidabbau aus Lecithin Glycerylphosphorylcholin (GPC) und aus Kephalin Glycerylphosphoryläthanolamin (GPÄ) entsteht. GPC hat jedoch in der Niere eine ganz spez. Funktion, nämlich eine Harnkonzentrierung durch NaCl-Rücktransport bzw. Na^+ -Austausch gegen NH_4^+ und H^+ ⁹⁵⁾.

GPC ist in erster Linie osmotisch wirksam⁹⁶⁾.

Der höhere Phosphatumsatz von Lecithin gegenüber Kephalin hat seine Parallele in einer höheren GPC-Konzentration der Nierenmarkzone gegenüber GPÄ⁹⁷⁾. Das Glycerin hingegen wird auf dem Umweg über die Spaltung des GPC zu Glycerin-1-P wieder in die Lipoidphase zurückgeführt⁹⁶⁾. Damit wird der niedrige Glycerineinbau von PC und PÄ verständlich.

4. Verhältnis von ^{32}P zu ^{14}C -Aktivitäten

Aus dem relativen Einbau von Phosphat und Glycerin kann man sehen, ob das Phosphatidmolekül de-novo synthetisiert oder aus Bruchstücken aufgebaut wird, die durch partielle Hydrolyse entstanden sind.

T a b e l l e 12
Verhältniszahlen von ^{32}P zu ^{14}C -Aktivität

Imp.	MPI	DPI	TPI	PS	PC	PÄ	CL
Leber	0.99	0.86	-	0.99	12.13	3.58	3.45
Hirn	0.51	0.18	0.13	0.39	0.77	0.96	0.50
Herz	0.17	0.19	-	0.27	1.49	1.32	0.47
Lunge	1.02	1.52	-	1.09	1.98	3.01	0.75
Milz	1.35	1.39	-	0.72	1.63	1.83	0.84
Niere	1.30	1.34	-	0.65	2.59	1.58	0.78

Die ^{32}P und ^{14}C -Impulse wurden aus demselben Phosphatid-fleck gemessen.

Die Verhältniszahlen liegen um den Wert eins (Tab. 12). Von dieser Regel weichen die Gehirn- und Herzmuskelphosphatide, ebenso Lecithin und Kephalin ab.

Betrachtet man die geringe Glycerinkonzentration im Blut ($5 \mu\text{mol}/100 \text{ ml}$) und die entsprechenden hohen Phosphatwerte ($2\text{--}5 \text{ mg}/100 \text{ ml}$), so müßte man bei gleichen ^{32}P -Phosphat- und ^{14}C -Glyceringaben eine Verdünnung des ^{32}P -Phosphats durch körpereigenes Phosphat annehmen. Es wären niedrigere ^{32}P -spez. Aktivitäten zu erwarten, zumal das Phosphat auch noch für andere Phosphorylierungsprozesse benötigt wird. Doch auch Glycerin unterliegt einem Abbau bzw. wird zum Aufbau anderer Stoffe verwendet. Das im Blut vorhandene Glycerin wird in Neutralfette, wie in Phospholipide eingebaut. Ebenfalls nachgewiesen ist der Einbau von Glycerin über die Triglyceride in die Glucose, sowie in ausgeatmetes CO_2 ⁹⁸⁾.

Von dem Wert eins abweichende Verhältniszahlen erkennen wir bei den Gehirn- und Herzmuskelphosphatiden, deren Glycerinumsatz den des Phosphats übersteigt.

Bei den Gehirnphosphatiden wird dies durch die sogenannte "Blut-Hirn-Barriere" verursacht. Diese Schranke hält anorg.

Phosphat weitgehendst zurück und gilt somit als Schranken-indikator⁹⁹⁾¹⁰⁰⁾. In Versuchen konnte nach 24 Std. nur 0.2 - 0.3% des eingesetzten Phosphats im Hirn wiedergefunden werden¹⁰¹⁾. Nach einer 4stündigen Einbauzeit betrug die Radioaktivität im Hirn 0.02% der Aktivität des Blutes im Körper gegenüber 18% in der Leber¹⁰²⁾.

Ähnlich wie im Gehirn geschieht der Übertritt des anorg. Phosphats vom Blut in die Muskelzellen sehr langsam.

Die Aktivität im Hirn erreicht erst 172 Std. nach der Injektion ihren Höhepunkt. Bis zu diesem Zeitpunkt findet ein zwar geringer, aber gleichmäßiger Übergang statt¹⁰³⁾. Beim Herzmuskel hängen diese niedrigen Werte vermutlich mit dem hohen Gehalt an anorg. Phosphat und der daraus resultierenden Verdünnung zusammen.

Das ^{32}P : ^{14}C -Verhältnis von Lecithin und Kephalin ist - außer in der Leber - um das 1.5 - 2fache höher, als das der übrigen Phosphatide.

In der Leber sind diese Zahlen noch höher und hier zeichnet sich offensichtlich eine Funktion der Phosphatide ab:

Die Triglyceride passieren durch Phospholipide und Proteine stabilisiert, als kleine Tröpfchen, sogenannte Chylomicronen, die Lymphbahn und gelangen über das Blut in die Leber. In der Leber nun findet eine Hydrolyse der Chylomicronen statt, mit anschließender, teilweiser Neusynthese. Die Triglyceride, mit neuen Fettsäuren versehen, verlassen, eingebaut in niedermolekulare Lipoproteide, die Leber. Die in der Leber aus Diglyceriden synthetisierten Phospholipide sind wichtige strukturelle Komponenten dieser Lipoproteide. Es scheint, daß die Triglyceride in dieser Form in die Fettdepots transportiert werden¹⁰⁴⁾.

Phospholipide allerdings, die in anderen Organen als der Leber synthetisiert werden, können von diesem Triglycerid-depot keinen Gebrauch machen¹⁰⁵⁾.

Die anderen Gewebe, mit Ausnahme der Haut¹⁰⁶⁾, können ihre Phosphatide aus kleineren Molekülen, die durch das Blut zu den Organen gelangen, selbst synthetisieren¹⁰⁷⁾.

Aus der Höhe der spez. Aktivitäten läßt sich eine besondere Funktion von Lecithin und Kephalin erkennen. Diesen N-haltigen Phosphatiden kommt offensichtlich in der Hauptsache die Stabilisierung der Triglyceride zu, während die anderen untersuchten Phosphatide nicht oder nur unbedeutend am Fettransport beteiligt sind.

D. Untersuchungen über den ^{32}P -Phosphatumsatz der Phosphatide bei verschiedener Phosphat-Applikation

Die meisten Phosphatidumsatzmessungen wurden in vitro an explantierten Organen durchgeführt. Demgegenüber ist die Zahl der Arbeiten, die auf in vivo Versuchen basieren, weit geringer. Über den Einbau peroral gegebenen ^{32}P -Phosphat in die Phosphatide verschiedener Organe sind jedoch kaum Arbeiten bekannt. Lediglich ARTOM und SWANSON¹⁰⁸⁾ verfütterten ^{32}P -Phosphat zusammen mit unmarkierten Phospholipiden. Ein Teil des anorg. Phosphats wurden zusammen mit den Phosphatiden über den Dünndarm aufgenommen.

Arbeiten auf dem Gebiet der Phosphatidforschung werden wahlweise in vivo, in vitro oder peroral durchgeführt, je nach der Untersuchungsrichtung. Bei in vivo Arbeiten hat man den Vorteil, die genauen physiologischen und enzymatischen Bedingungen eines lebenden Tieres anzutreffen. Will man jedoch nach Zugabe von Drogen Umsatzänderungen studieren, so ist in den meisten Fällen nur ein in vitro-Versuch möglich, da die notwendige Konzentration in den Organen zum Tod des Tieres führen würde. Hingegen sind Studien bezüglich der Resorption von Arzneimitteln nur per Os durchzuführen.

Um Ergebnisse aus verschiedenen Untersuchungen vergleichen zu können, muß man die Einbaugeschwindigkeit von Phosphat und die Umsatzhöhen der Phosphatide bei den drei genannten Versuchswegen kennen.

Wir untersuchten daher den Einbau bei verschiedener Applikation: Der ersten Versuchsgruppe gaben wir ^{32}P -Phosphat in den Magen, einer zweiten Gruppe injizierten wir das aktive Phosphat subkutan und als Vergleich hierzu machten wir in-vitro Einbauversuche.

1. Ergebnisse

Bei den per Os Versuchen gaben wir $50\ \mu\text{C}\ ^{32}\text{P}$ -Phosphat trägerfrei mit einer Schlundsonde in den Magen einer 200 g schweren, weiblichen Albinoratte. Das Tier blieb zuvor 18 Std. ohne Nahrung. Bei den in-vivo Versuchen injizierten wir $50\ \mu\text{C}$ isotonische ^{32}P -Phosphatlösung subkutan in die Rückenpartie weiblicher Ratten mit 200 g Lebendgewicht.

Die in-vitro Versuche führten wir mit frischen Rattenorganen in der Warburg-Apparatur durch. Zu 2 ml Nährlösung nach KREBS-HANSELEIT¹⁰⁹⁾ gaben wir $100\ \mu\text{C}\ ^{32}\text{P}$ -Phosphat. Während des Einbaus wurde die Nährlösung mit Carbogen durchspült.

Die Organe Leber und Gehirn wurden untersucht, da deren Umsatz die höchsten bzw. niedrigsten Werte aufweist. Die Aufarbeitung der Organe geschah wie auf Seite 30 beschrieben.

In Tabelle 13, S.40, sind die spez. Aktivitäten bei verschiedener Applikation aufgeführt.

T a b e l l e 13

Spez.Aktivitäten bei verschiedener Darreichungsform

		spez.Aktivitäten (Imp./Min./ γ P)						
		MPI	PS	DPI	SM	PC	PA	CL
Leber	per Os	99	161	-	266	438	468	120
	subkutan	250	282	-	373	551	540	230
	in vitro	4038	695	-	2787	3840	6983	758
Hirn	per Os	-	-	-	-	-	-	-
	subkutan	36	13	82	21	20	18	11
	in vitro	3915	484	3837	553	1089	877	1040

per Os	-	50 μ C	32 P-Phosphat trägerfrei, 200 g Ratte
subkutan	-	50 μ C	32 P-Phosphat trägerfrei, 200 g Ratte
in vitro	-	100 μ C	32 P-Phosphat trägerfrei, 7.8 g Leber 1.12 g Hirn

2. Diskussion

Da wir s u b k u t a n und p e r o r a l die gleichen Aktivitäten gaben, lassen sich die Ergebnisse direkt miteinander vergleichen. Wie aus Tabelle 13 zu ersehen ist, sind die spez.Aktivitäten der Leberphosphatide nach peroraler Applikation niedriger, als bei subkutaner. Bei subkutaner Injektion gelangt das Phosphat fast augenblicklich in die Blutbahn, während per Os gegebenes Phosphat nur langsam über den Magen-Darm-Kanal ins Blut diffundiert. Dementsprechend ist auch der Phosphateinbau in die Leberphosphatide bei subkutaner Injektion größer, als bei per Os Gaben.

Im Gehirn liegen die Verhältnisse anders. Durch die Blut-Hirn-Barriere gelangt das Phosphat nur sehr langsam ins

Gehirn. Bei subkutaner Injektion von Phosphat konnten wir noch eine geringe spez. Aktivität finden, währenddessen peroral bei dieser Phosphatkonzentration keine meßbaren Aktivitäten im Gehirn mehr festgestellt werden konnte.

Untersuchungen zur Überwindung der Blut-Hirn-Barriere machte YBEMEA¹⁰¹⁾. Er fand 24 Std. nach intracisternaler Injektion von anorg. Phosphat noch 30% der injizierten Aktivität im Gehirn wieder. Bei intraperitonealer Injektion hingegen gelangen nur 0.2 - 0.3% ins Gehirn.

Die Werte des *in vitro* Versuchs liegen weit höher, da wir 100 μ C ³²P-Phosphat für eine Organmenge von 7.8 g Leber bzw. 1.12 g Hirn gaben.

Bemerkenswert sind hierbei die hohen spez. Aktivitäten der Leber-, sowie der Hirninositphosphatide mit Werten um 4000. In der Leber sind Lecithin (3840) und Kephalin (6983) am höchsten markiert, während PS und CL einen weit geringeren Umsatz haben. Die spez. Aktivität des SM beträgt etwa die Hälfte des Kephalins.

Das Hirnlecithin und -kephalin bleibt hinter dem Einbau von MPI (3915) und DPI (3837) zurück, hingegen erreicht das CL die spez. Aktivität von Lecithin. SM und PS erreichen nur die Hälfte davon.

Die Umsätze der einzelnen Phosphatide liegen bei den verschiedenen Applikationsarten immer im gleichen Verhältnis zueinander.

Zwei Gewebe weichen hiervon ab:

Im Hirn weist das DPI bei subkutaner Injektion des Phosphats die doppelte spez. Aktivität auf wie das MPI, während *in-vitro* für DPI und MPI dieselben spez. Aktivitäten ermittelt wurden.

In der Leber finden wir umgekehrt subkutan für PC und PA dieselben spez. Aktivitäten, während *in vitro* PA den doppelten Umsatz hat, wie PC.

E. Vergleich der spez. Aktivitäten bei steigenden Phosphat- konzentrationen der Injektionslösung

Würden die spez. Aktivitäten mit steigenden Phosphatkonzentrationen linear zunehmen, so wäre es möglich, auf mathematischem Weg aus einem Wert jede beliebige Konzentration zu errechnen.

Als Versuchsanordnung nahmen wir weibliche Ratten mit einem Körpergewicht von 200 g und injizierten verschiedene Aktivitäten ^{32}P -Phosphat. Die Inkubationszeit betrug 24 Std. Wir untersuchten die Auswirkungen verschiedener Konzentrationen auf die Phosphatide von Leber und Hirn, da diese Organe die höchsten bzw. niedrigsten Umsätze haben.

T a b e l l e 14

Spez. Aktivitäten bei steigenden Phosphatmengen in vivo

Leber mC	MPI	PS	PC	PÄ	CL	SM	DPI
Imp./Min.							
0.025	93	132	179	178	116	139	
0.05	250	282	351	340	230	373	
0.125	897	878	1277	1230	615	1185	
0.25	1390	2069	2041	2096	1187	2185	
0.5	2553	2936	4102	4285	1196	3020	
Hirn							
0.025	26	9	7	8	6	11	68
0.05	36	13	20	18	11	21	82
0.125	117	30	53	51	37	26	193
0.25	202	43	89	82	65	37	196
0.5	248	59	105	98	80	43	213

Versuchstiere: Ratte 200 g

Inkubationszeit: 24 Std.

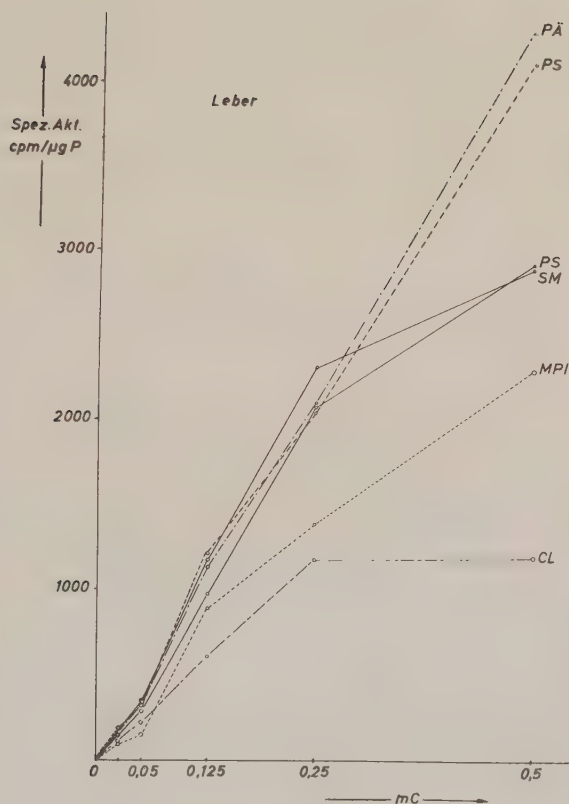


Abb. 5

Spez. Aktivitäten der L e b e r phosphatide nach steigenden ^{32}P -Phosphatkonzentrationen

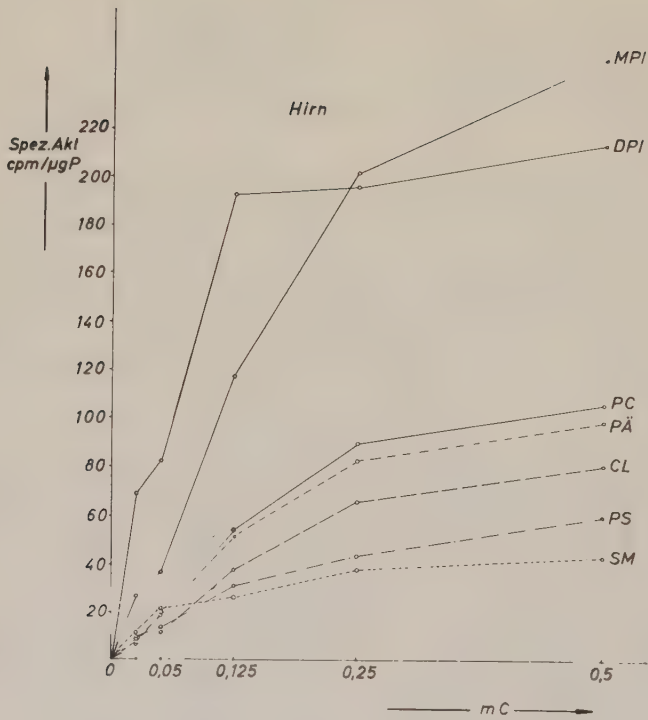


Abb. 6

Spez. Aktivitäten der Gehirnpusphatide nach steigenden ^{32}P -Phosphatkonzentrationen

1. Ergebnisse und Diskussion

Wie aus Abb.5, S.43, ersichtlich ist, weisen in der Leber PC und PA den höchsten Einbau auf. Sie haben bei allen Konzentrationen einen nahezu gleichen Wert. Diese beiden zeigen mit geringen Abweichungen dieselbe spez.Aktivität.

Das MPI der Leber zeigt bei 0.025 mC P^{32} nur einen geringen Einbau, der jedoch bis 0.125 mC ständig ansteigt. Bis zu einer Konzentration von 0.5 mC ist der prozentuale Anstieg geringer.

Beim SM und PS der Leber ist die Zunahme der spez.Aktivität bei steigender Aktivität ähnlich der von MPI. SM weist gegenüber PS einen etwas erhöhten Einbau auf.

Das CL der Leber zeigt den niedrigsten Umsatz aller Phosphatide. Es hat sein Maximum bei 0.25 mC erreicht.

Das Hirn zeigt gegenüber der Leber bis zu einer Aktivität von 0.25 mC einen steten Anstieg, doch ist die Zuwachsrates bis 0.5 mC für alle Phosphatide geringer. Ausgenommen hiervon sind die Inositphosphatide des Hirns, die bis zu einer Konzentration von 0.5 mC einen Anstieg der Einbaurates aufweisen.

Das MPI hat bei einer Konzentration von 0.05 mC eine minimale spez.Aktivität. Bei 0.125 mC steigt der Einbau stark an und erreicht bei 0.5 mC den höchsten Wert der Hirnphosphatide.

Ähnliche Werte sind beim DPI zu beobachten. Bis zu einer Konzentration von 0.025 mC sind nur geringe spez.Aktivitäten zu erkennen, doch steigt der Einbau bis 0.125 mC schnell an und erfährt bis 0.5 mC noch eine kleine Steigerung.

Anders wie bei der Leber sind die Inositphosphatide des Hirns am höchsten markiert. Sie überragen bezüglich der spez.Aktivität PC und PÄ bei weitem.

Auch beim CL kann man einen über die spez.Aktivität des PS und SM hinausgehenden Einbau feststellen.

Sowohl bei den Leber- als auch bei den Hirnphosphatiden finden wir, wie die Abb. 5 und 6 (S.43/44) zeigen, bis zu einer Konzentration von 0.25 mC P^{32} einen steten Anstieg der spez.Aktivitätskurve.

Bei Aktivitäten, die über diesen Wert hinausgehen, findet zwar noch eine Erhöhung der spez.Aktivitäten statt, doch ist der prozentuale Anstieg der spez.Aktivitätskurve geringer.

Die in-vivo Einbauraten liegen bei dieser Aktivität in solchen Größenordnungen, daß sie gut erfaßt werden können.

Bei steigenden Konzentrationen wäre ein im gleichen Verhältnis stehender Anstieg der spez.Aktivitäten zu erwarten. Dies finden wir auch bei den niedrigsten Konzentrationen bestätigt, doch flacht bei weiterem Konzentrationsanstieg die Kurve immer mehr ab. Diese Erscheinung kann nicht auf ein Überangebot an ^{32}P -Phosphat zurückgeführt werden; vielmehr scheint hier eine Strahlenschädigung des Enzymsystems vorzuliegen. Besonders Enzyme mit -SH-Gruppen sind nach Auffassung von FRITZ-NIGGLI¹¹⁰⁾ äußerst strahlenempfindlich. Dieser Autor begründet die Wirkung der -SH-Radikale mit einem "Wegfangen der Strahlenwirkung", indem die Radikale selbst oxydiert werden oder das strahlengefährdete Enzym durch die -SH-Gruppe vorübergehend in eine strahlenresistente Form gewandelt wird.

Eine andere Meinung vertritt GLOCKNER¹¹¹⁾. Er führt die Wirkung von Strahlen auf eine Zellschädigung durch H_2O_2 zurück, das bei hohen Ionendichten bevorzugt aus H^+ und OH^- -Radikalen gebildet wird.

Aus unseren Ergebnissen ist zu folgern, daß die spez.Aktivitäten nicht von einer Konzentration auf eine höhere oder niedrigere umgerechnet werden können.

Besonders bei gleichzeitiger Markierung der Phosphatide mit zwei Isotopen sind die gleichen Konzentrationen unbedingt erforderlich, da die Strahlenschädigung bei steigenden Konzentrationen im Quadrat zunimmt. Durch Injektion verschiedener ^{32}P -Phosphatmengen würde ein ungleicher Einbau der beiden Isotope stattfinden und die Ergebnisse verfälschen.

F. Abhängigkeit des ^{32}P -Phosphateinbaus von Alter und Gewicht der Versuchstiere

Eine Bedingung für unsere Versuche ist, alle störenden Einflüsse, die den Phosphatumsatz ändern können, auszuschalten. Hierzu gehören auch Faktoren, wie Alter und Gewicht der Versuchstiere.

1. Bisherige Arbeiten

WRBA¹¹²⁾ fand bei in vitro-Versuchen mit ^{32}P -Phosphat in embryonalen und adulten Rattenorganen einen unterschiedlichen Phosphatumsatz beider Altersgruppen. In embryonalen Organen zwischen dem 15. und 18. Schwangerschaftstag war doppelt soviel ^{32}P -Aktivität in den Gesamtlipoiden, wie in Lipoiden erwachsener Ratten. Eine Ausnahme bildet dabei das Herz, dessen Lipide bei ausgewachsenen Tiere eine größere Aktivität besaß, als bei embryonalen.

Ähnliche Feststellungen machten GARATTINI und Mitarb.¹¹³⁾. In Gehirnschnitte junger Tiere diffundierte mehr Aktivität, als in Schnitte älterer Ratten. Ferner untersuchten diese Autoren das Gehirn 16 Tage alter Ratten und ermittelten für die weiße Gehirnmasse eine 5mal so große ^{32}P -Aktivität wie für die graue.

DAVISON und DOBBING¹¹⁴⁾ beobachteten nach Injektion von radioaktivem anorg. Phosphat bei jungen Ratten einen hohen Umsatz der Hirnphosphatide. Während einer Periode von 100 Tagen nahm die spez. Aktivität nur langsam ab. Bei Injektionen bei älteren Tieren konnten sie diese langlebigen Phosphatide nicht finden. Diese Autoren schlossen auf einen Phosphatidanteil, der in den ersten Tagen gebildet wird und erst im Alter einem Abbau unterliegt.

THOMPSON und BALLOU¹¹⁵⁾ injizierten bzw. verfütterten $^3\text{H-H}_2\text{O}$ und untersuchten den Tritiumeinbau in verschiedene Stoffwechselprodukte. Obwohl sie die Hirnphosphatide nicht im einzelnen studierten, konnten sie doch einen sehr langlebigen Phosphatidanteil ermitteln (220 Tage).

Diese Untersuchungen wurden mit den Gesamtlipoiden oder deren Aktivitäten im Hirn durchgeführt. Die altersbedingte Abhängigkeit der einzelnen Phosphatide finden wir jedoch nicht beschrieben. Diese Abhängigkeit erlangt besondere Bedeutung, da in Reihenversuchen oft Tiere verschiedenen Alters verwendet werden.

2. Eigene Untersuchungen

Zwischen den Begriffen Gewicht und Alter von Albinoratten besteht ein direkter Zusammenhang. HAGEMANN¹¹⁶⁾ hat diese Beziehungen untersucht und für das jeweilige Alter die Gewichte für männliche und weibliche Ratten angegeben.

Die ^{32}P -Einbauarbeiten werden hauptsächlich mit 200 g schweren Tieren durchgeführt, deren Gewicht einem Alter von 60 Tagen entspricht. Um altersbedingte Umsatzschwankungen feststellen zu können, wurden vier verschiedene Tiergruppen ausgewählt:

- | | | | |
|-----------|---------|---|---------------|
| 1. Gruppe | 73 Tage | - | 300 g Gewicht |
| 2. Gruppe | 45 Tage | - | 100 g Gewicht |
| 3. Gruppe | 35 Tage | - | 60 g Gewicht |
| 4. Gruppe | 13 Tage | - | 25 g Gewicht |

Den männlichen Ratten dieser vier Gruppen wurde 0.2 mC/100 g ^{32}P -Phosphat subkutan injiziert. Nach 24 Std. wurden die Tiere getötet und die Organe wie auf Seite 30 beschrieben aufgearbeitet.

In Tabelle 14 sind die spez. Aktivitäten in Abhängigkeit vom Alter aufgeführt.

T a b e l l e 14

Spez. Aktivitäten in Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere

		Imp./Min./γ P						
Organ		MPI	DPI	PS	PÄ	PC	SM	CL
Leber	I	1215		1046	1157	1127	875	739
	II	1613		1396	1523	1582	954	909
	III	2483		2054	2710	2834	1045	1082
	IV	3499		2581	3658	3698	1741	1987
Hirn	I	159	201	67	38	76	30	45
	II	284	245	126	52	79	67	37
	III	232	365	175	74	109	61	53
	IV	407	473	217	117	139	84	70
Lunge	I	1220		268	419	819	159	
	II	1116		475	1098	1032	173	
	III	1196		834	1078	1300	211	
	IV	1825		980	1350	1949	445	
Milz	I	314		308	553	987	139	
	II	373		388	584	982	181	
	III	418		513	609	1030	215	
	IV	494		671	802	1341	434	

Alter: I - 73 Tage - 300 g Gewicht
 II - 45 Tage - 100 g Gewicht
 III - 35 Tage - 60 g Gewicht
 IV - 13 Tage - 25 g Gewicht

Subkutane Injektion (0.2 mC/100 g Gewicht) isotonischer ^{32}P - Na_2HPO_4 -Lösung

Einbauzeit: 24 Std.

3. Diskussion

Aus Tabelle 14 ist zu entnehmen, daß die Phosphatide jüngerer Tiere gegenüber älteren einen erhöhten Phosphat-Einbau haben. Der Phosphatumsatz sinkt mit zunehmendem Alter ab. Besonders auffällig ist diese Erscheinung in der Leber und im Hirn. Bei Milz und Lunge ist der höhere Umsatz jüngerer Tiere gegenüber älteren nicht so stark ausgeprägt. Herausragend sind die Umsatzverhältnisse im Hirn: Der Umsatzrückgang von den 13 Tagen alten Tieren zu den 35 Tage alten, beträgt 30 - 40%. Zwischen den übrigen Altersstufen ist die Umsatzdifferenz nicht mehr so groß.

Die Werte von Lecithin und Kephalin treten innerhalb der einzelnen Organe aus der Reihe der restlichen Phosphatide hervor. Der Umsatz dieser N-haltigen Phosphatide überragt bei 13 Tagen alten Tieren die spez. Aktivitäten der übrigen Phosphatide. Ausgenommen bleibt hiervon nur das Hirn, dessen Inositphosphatide den dreifachen Umsatz wie PC oder PÄ haben. Bei den höheren Altersgruppen nimmt der Phosphatumsatz aller Phosphatide zwar ab, doch hat PC und PÄ einen größeren Rückgang, als die übrigen Phosphatide. Berücksichtigt man, daß PC und PÄ über 50% des Phosphatidanteils in den Organen ausmacht, so wird der von WRBA beschriebene starke Rückgang des Gesamtphosphatidumsatzes verständlich.

Der Umsatz von Leberlecithin und -kephalin, der bei 13 Tagen alten Ratten Werte um 3600 aufweist, fällt bis zu den 73 Tagen alten Tieren auf 31 bzw. 30% ab, gegenüber MPI mit 35% oder PS mit 40%.

In allen Organen sinkt der Umsatz von Kephalin etwas mehr ab, als der von Lecithin. Für diese beiden N-haltigen Phosphatide und die Lunge beträgt der Rückgang zwischen 60 und 70%, nur die Milz steht außerhalb dieser Werte mit einem Umsatzabfall von 30 - 40%. Eine ähnliche Übereinstimmung finden wir bei den Inositphosphatiden. Der Umsatzrückgang

dieser Phosphatidgruppe von den 13 Tagen alten Ratten bis zu den 73 Tagen alten, beträgt in der Leber und im Hirn zwischen 60 und 65%, während der Umsatz der Lungen- und Milzinositphosphatide um 35% zurückgeht.

G. Einfluß von γ -Strahlen auf den Phosphateinbau in die Phosphatide

Ähnlich dem Wirkungsmechanismus verschiedener Arzneimittel, die lediglich die Durchlässigkeit der Zellmembranen verändern, vermutet man nach Ganzkörperbestrahlung ebenfalls eine Permeabilitätsänderung.

Die Auswirkungen einer Strahlenbelastung von Tieren wurden auf verschiedenen anderen Stoffgebieten bereits untersucht.

1. Bisherige Arbeiten

GOULD¹¹⁷⁾ konnte nachweisen, daß der Einbau von ^{14}C -Acetat und ^{14}C -Mevalonsäure in Sterine durch Ganzkörperbestrahlung gesteigert werden kann. 48 Std. nach der Bestrahlung ist der Acetateinbau in Lebercholesterin proportional der Bestrahlungsdosis angestiegen.

Bei in vitro Versuchen ist ein erhöhter Einbau von Acetat und Mevalonsäure in Squalene zu erkennen, wenn die Leber eines zuvor bestrahlten Tieres verwendet wurde¹¹⁹⁾.

Außerdem Cholesterin wurde auch die Fettsäurefraktion untersucht, doch war der Umsatz nur unwesentlich erhöht¹²⁰⁾.

WRBA und Mitarb.¹²¹⁾ setzten Ratten einer 800 r Ganzkörperbestrahlung aus, injizierten ^{32}P -Phosphat und stellten die Radioaktivitätszunahme in der Leber gegenüber unbestrahlten Vergleichstieren fest. Die größte Zunahme mit 28% wurde 12 Std. nach der Bestrahlung ermittelt. WRBA untersuchte lediglich die Gesamtaktivität der getrockneten und veraschten Leber. Parallel mit der gesteigerten Phosphataufnahme weisen diese Autoren jedoch auf einen vermehrten Einbau

anorg. Phosphats in hochmolekulare Verbindungen hin.

SKALKA¹²²⁾ berichtet von einer Gehaltszunahme der Gesamtlipoide in den Leber- und Nierengeweben nach einer 650 r Ganzkörperbestrahlung. Dieser Autor macht verschiedene Faktoren für den Gehaltsanstieg der Gesamtlipoide verantwortlich. Er vermutet eine Dysfunktion des endokrinen Systems, Sepsis, Intoxikationen von gebildeten Stoffwechselprodukten oder bakterielle Toxine.

In einer anderen Arbeit untersuchte SKALKA¹²³⁾ den Stoffwechsel der Gesamthospholipide bei bestrahlten Ratten (540 - 600 r). Nach 3 Tagen war der Phosphatidumsatz auf 109% angestiegen, 6 Tage später ist der Ausgangswert wieder erreicht und zwischen dem 9. und 12. Tag sinkt der Gesamthospholipidumsatz bis auf 76% des Normalwertes ab.

MEFFERD¹²⁴⁾ beschritt einen anderen Weg, den Lipidstoffwechsel nach Ganzkörperbestrahlung zu beobachten. Er injizierte Ratten in verschiedenen Zeitintervallen ¹⁴C-Acetat. Aus der Radioaktivität der Fettsäuren schloß er auf den Stoffwechsel der Leber. Auch MEFFERD konnte nach Bestrahlung einen erhöhten Umsatz der Lipoide finden.

2. Eigene Arbeiten

Die besprochenen Arbeiten beziehen sich lediglich auf den Phosphatgehalt in der Leber und Niere oder auf die Gesamtlipoide in den Organen. Je nach dem, ob der Umsatz aller Phosphatide gleichermaßen verändert wird oder nur einzelne Biosynthesestufen angeregt werden, läßt sich erkennen, ob es sich um eine Stimulierung des Stoffwechsels handelt oder nur um eine Permeabilitätsänderung für anorg. Phosphat und daraus resultierend um eine gesteigerte Phosphatidsynthese.

Im Rahmen unserer Problemstellung, den Einfluß verschiedener Faktoren auf den Umsatz von Phosphatiden zu untersuchen, beobachteten wir die Ergebnisse von γ -Bestrahlungen in diversen Organen des Tierkörpers.

Wir wählten Ratten mit einem Gewicht von 200 g. Pro Versuch wurden 6 Tiere eingesetzt, weitere 6 dienten zum Vergleich. Die Tiere erhielten Ganzkörperbestrahlungsdosen von 600 r. 12, 48, 168 und 240 Std. nach der Bestrahlung wurde pro Tier 0,25 mC ^{32}P -Phosphat subkutan appliziert. 24 Std. nach der Injektion wurden die Tiere ausgeblutet, Lunge, Leber, Milz und Hirn entnommen und nach der auf Seite 27 beschriebenen Methode aufgearbeitet.

Tabelle 15, S. 54, stellt eine Zusammenfassung der spez. Aktivitäten verschiedener Organe dar:

T a b e l l e 15

Auswirkungen einer Ganzkörperbestrahlung auf den Phospholipidstoffwechsel

Substanz	Std. n.d. Bestrah- lung	Spez.Aktivität (cpm/ μ g P)							
		Leber	%	Milz	%	Hirn	%	Lunge	%
PC	12	2520	32	888	67	33	65	1216	53
	48	2170	14	641	21	22	10	875	10
	168	1920	1	476	-10	18	-10	826	4
	240	1830	-3	400	-24	16	-20	759	-4
	Norm	1900	-	529	-	20	-	791	-
PÄ	12	2570	28	587	48	30	114	776	73
	48	2120	6	439	11	15	7	512	14
	168	1960	-2	378	-4	13	-7	414	-7
	240	1940	-3	304	-23	14	0	407	-9
	Norm	2000	-	395	-	14	-	448	-
PS	12	2162	57	569	90	24	84	262	56
	48	1540	12	296	1	8	-38	204	22
	168	1410	2	263	-11	4	-69	169	1
	240	1320	-3	261	-12	6	-53	162	-2
	Norm	1370	-	298	-	13	-	167	-
MPI	12	1989	77	849	65	63	103	1993	70
	48	1320	17	614	19	50	61	1690	45
	168	1160	3	440	-14	31	0	1032	-3
	240	1020	-8	459	-10	27	-12	861	-26
	Norm	1120	-	512	-	31	-	1171	-
SM	12	2270	41	305	32	32	60	432	82
	48	1620	1	355	54	29	45	368	55
	168	1530	-4	218	-5	20	0	222	-6
	240	1510	-5	167	-27	21	5	205	-13
	Norm	1600	-	230	-	20	-	237	-
CL	12	1185	44	300	39	20	42	420	82
	48	1040	26	322	49	15	7	238	3
	168	750	-8	168	-13	10	-28	198	-13
	240	650	-20	118	-45	9	-37	202	-12
	Norm	820	-	215	-	14	-	230	-

% - (+) Anstieg; (-) Abfall bezogen auf die Norm

Norm - Mittelwert von 4 Blindtieren

Das radioaktive Phosphat wurde 24 Std. vor dem Töten der Tiere injiziert.

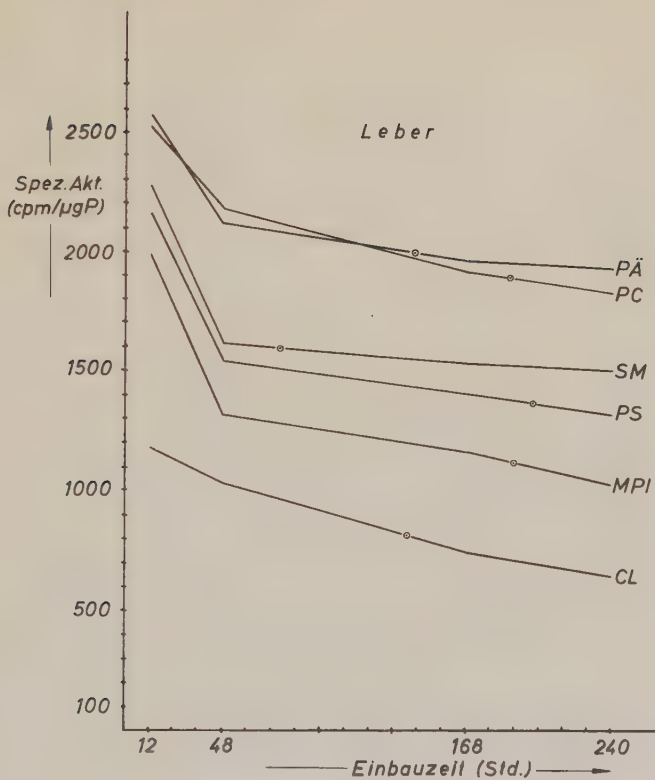


Abb. 7

Einfluß von Ganzkörperbestrahlung auf den Umsatz der
L e b e r phosphatide

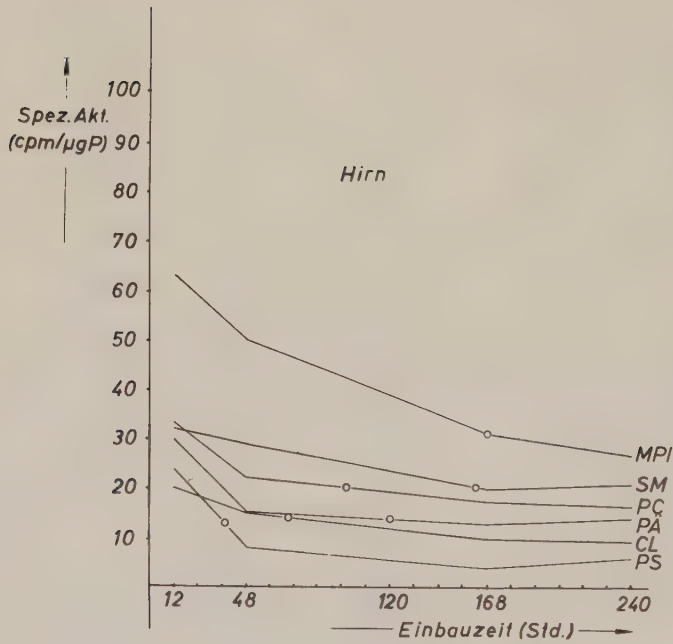


Abb. 8

Einfluß von Ganzkörperbestrahlung auf den Umsatz der
G e h i r n phosphatide

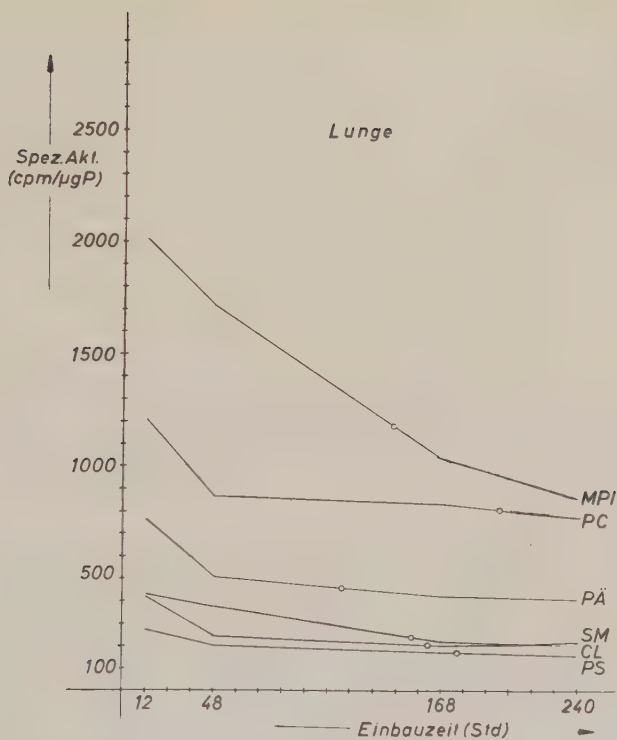


Abb. 9

Einfluß von Ganzkörperbestrahlung auf den Umsatz der
L u n g e n p h o s p h a t i d e

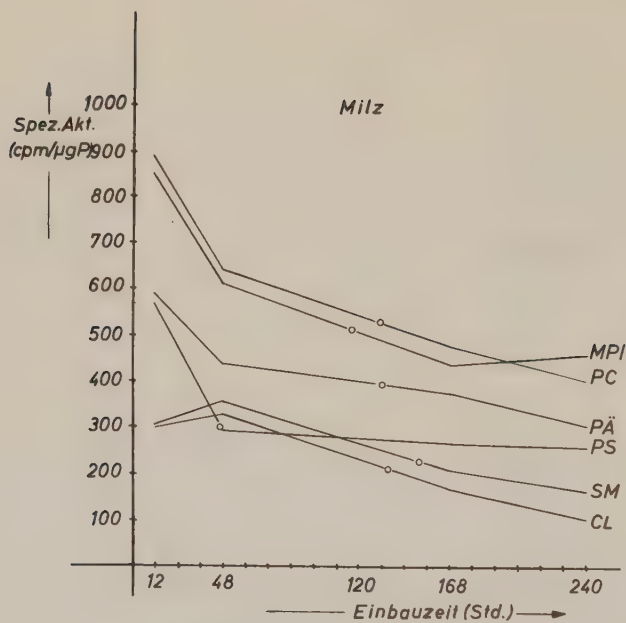


Abb. 10

**Einfluß von Ganzkörperbestrahlung auf den Umsatz der
M i l z phosphatide**

3. Diskussion

Wie aus Tabelle 15, S. 54, zu entnehmen ist, erhöht sich der Phosphatumsatz der Phosphatide aller Organe bei den Tieren, denen 12 Std. nach der Betrahlung radioaktives Phosphat gespritzt wurde. Die Norm (unbestrahlter Vergleichstiere) wird zu diesem Zeitpunkt um 20 - 90% überschritten. Nach etwa 168 Std. kehrt der Phosphatumsatz zur Norm zurück, doch finden wir nach 240 Std. ein Absinken der spez.Aktivitäten unter die Norm.

In den einzelnen Organen herrschen folgende Verhältnisse:

Leber

In der Leber finden wir 12 Std. nach der Bestrahlung und nach 24stündiger Inkubationszeit eine etwa 30%ige Erhöhung des ^{32}P -Phosphat-Einbaus bei Lecithin und Kephalin.

Die größte Abweichung von der Norm hat das Monophosphoinositid mit 77%. Die restlichen Phosphatide PS, CL und SM erfahren eine Steigerung um 57 bzw. 40%. Berücksichtigt man den prozentualen Anteil der einzelnen Phosphatide an den Gesamtphosphatiden der Leber, so erhalten wir, genau wie WRBA¹²¹⁾, eine Erhöhung des Gesamtphosphatidumsatzes von 30%. Aus den weit differierenden Umsatzsteigerungen der einzelnen Phosphatide ist zu ersehen, daß es nicht möglich ist, nach Umsatzmessungen der Gesamtphosphatide auf einzelne Phosphatide zu schließen.

Wenn die radioaktive Substanz erst 48 Std. nach der Bestrahlung injiziert wird, beträgt die Steigerung gegenüber den unbestrahlten Tieren nur noch 10%.

Nach 168 Std. ist bei allen Leberphosphatiden die Norm wieder erreicht; nach einer Zwischenzeit von 240 Std. wird die Einbaunorm um durchschnittlich 5% unterschritten.

Milz

Ein weniger einheitliches Verhalten zeigen die Phosphatide der Milz. Mit einer Erhöhung der Lecithin- und Kephalin-spez.Aktivitäten um 67 bzw. 48% bei 12stündiger Zwischen-

zeit, liegt der Anstieg über den entsprechenden Werten der Leber.

Das Phosphatidylserin hat mit 90% die größte Umsatzsteigerung. Allerdings sinkt der Umsatz dieses Phosphatids nach 48 Std. bis nahezu auf die Norm ab.

Die übrigen Phosphatide der Milz haben nach 48 Std. noch eine Umsatzerhöhung aufzuweisen. Bei Lecithin und Kephalin liegt der Anstieg bei 21 bzw. 11%. Das Monophosphoinositid hat eine 19%ige Erhöhung. Das Sphingomyelin und das Cardiolipin erreichen erst 48 Std. nach der Bestrahlung mit 54 bzw. 49% ihre höchsten Umsätze. Der Phosphatumsatz der Milzphosphatide geht nach Erreichen der Norm bei 168 Std. kontinuierlich zurück. Bei der letzten Untersuchung nach 240 Std. lag der Umsatz 20 - 25% unter der Norm.

Hirn

Das Gehirn erfährt die größte Steigerung des Phosphateinbaus durch eine Ganzkörperbestrahlung. Die Erhöhung des Umsatzes beträgt bei den Phosphatiden dieses Organs nach 12 Std. Zwischenzeit zwischen 60 und 100%. Die größten Abweichungen finden wir beim Monophosphoinositid mit 103% und beim Kephalin mit 114%. Es folgen Phosphatidylserin mit 84% und Lecithin mit 65% Erhöhung. Die Stoffwechselerhöhung der Phosphatide ist nach 12 Std., ähnlich wie bei den Leberphosphatiden, nur von kurzer Dauer. Schon 48 Std. nach der Strahlenbelastung läßt sich bei den meisten Hirnphosphatiden eine Rückkehr zur Norm feststellen. Eine Ausnahme macht nur das Monophosphoinositid, das nach 48 Std. noch um 61% abweicht und erst nach 168 Std. die Norm erreicht.

Lunge

In der Lunge fanden wir 12 Std. nach der Bestrahlung die größte Abweichung. Während Lecithin und Kephalin

-um 73% bzw. 53% von der Norm abweichen, hat das Monophosphoinositid eine 70%ige Erhöhung, für das Sphingomyelin und Cardiolipin konnten wir sogar eine Steigerung um 82% finden.

Die Ganzkörperbestrahlung bewirkt nach einer 12stündigen Zwischenzeit bis zur Injektion einen erhöhten Phosphatumsatz der Phosphatide. Die Erhöhung des Phosphateinbaus ist jedoch bei den einzelnen Phosphatiden recht unterschiedlich; somit spiegelt eine Bestimmung des Phosphateinbaus der Gesamtposphatide ein sehr verzerrtes Bild wieder. Das MPI der Leber z.B. hat einen bei 77% liegenden Anstieg, doch ist sein Anteil an den Gesamtposphatiden ($2.41\%^{125}$) so gering, daß nur eine kleine Erhöhung des Gesamtposphateinbaus resultiert.

Der erhöhte Phosphateinbau der Phosphatide kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Entweder der Stoffwechsel wird durch Einwirkung von γ -Strahlen angeregt, etwa durch Ausschalten von Biosynthesehemmstoffen oder die Strahlung bewirkt eine Permeabilitätsänderung für anorganisches Phosphat. Für die zweite Vermutung spricht eine Untersuchung von KUNTA und Mitarb.¹²⁶, die im Muskelgewebe von bestrahlten Ratten die vierfache Menge anorg.Phosphats fanden, wie in unbestrahlten Vergleichstieren. Unsere Untersuchungen gehen noch einen Schritt weiter, indem wir die Erhöhung des Phosphateinbaus in die einzelnen Phosphatide studierten. Auch unsere Ergebnisse weisen auf eine erhöhte Durchlässigkeit für anorg.Phosphat und damit auf eine höhere spez.Aktivität hin.

Besonders im Gehirn, in das durch die Blut-Hirn-Barriere nur wenig Phosphat gelangt, wird die Permeabilitätsänderung offenbar. In diesem Organ ist die Steigerung der spez.Aktivitäten bis auf das doppelte gegenüber den anderen Organen angestiegen. Auch finden wir eine Parallele zwischen Hirn und Muskelzelle. In beiden Geweben geht der Übergang des anorganischen Phosphats vom Blut in die Gewebe nur sehr langsam vor sich.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Durchführung der Extraktion

1. Lyophilisieren und Pulverisieren

Die Versuchstiere werden mit Äther narkotisiert und durch Öffnen der Halsschlagader getötet. Nach dem Ausbluten werden die Organe entnommen, bei -25°C eingefroren und in der Leybold-Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Die so getrockneten Organe werden ohne Zusatz eines Lösungsmittels mit gereinigtem Sand zerrieben.

2. Extraktion

Ein Teil des pulverisierten Gewebes wird mit 30 Teilen peroxydfreiem Äther versetzt und 12 Stunden im Soxhlet extrahiert. Das Lösungsmittel wird mit dem Büchi-Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert. Die damit gegebenen niedrigen Temperaturen gewähren eine schonende Behandlung der Lipide.

Die trockenen Extrakte werden in einem Gemisch aus Methanol/Chloroform/Tetrahydrofuran (1:1:1) mit 5% Wasser gelöst, so daß in 0.1 ml Lösungsmittel 5 mg Substanz enthalten ist.

B. Quantitative Phosphatidbestimmung

Nach der Methode von WAGNER, HÖLZL, LISSAU und HÖRHAMMER¹²⁷⁾ wird die quantitative Phosphatidbestimmung durchgeführt. Die Auftrennung der Lipidextrakte erfolgt auf Formalin-imprägniertem Papier. 2.0 mg Substanz wird je Startfleck aufgetragen.

1. Papierchromatographische Auftrennung

Die chromatographische Auftrennung der Lipidextrakte erfolgt in zwei Richtungen. Als Laufmittel in der ersten

Richtung benutzten wir die Oberphase des Gemisches Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5). Bei aufsteigender Chromatographie beträgt die Laufzeit für 24 cm 11 Stunden.

Nach völligem Trocknen des Papiers trennten wir die Phosphatide in der zweiten Richtung auf. Als Fließmittel diente die Mischung Tetrahydrofuran/Diisobutylketon/Wasser (45:5:6). Laufzeit 4 Std.

Die Chromatographie auf Silikagelpapier mit dem Laufmittel Diisobutylketon/Eisessig/Wasser (40:20:3) erfolgt über eine Wegstrecke von 35 cm. Die Laufzeit hierfür beträgt bei 20°C 12 Std.

2. Anfärbereagenzien

- a) Rhodamin B wässrig 0.1%¹²⁸⁾, Nilblau 0.05%¹²⁹⁾

Das Chromatogramm wird kurze Zeit in die Lösung getaucht und dann 30 Min. in fließendem Wasser gewaschen. Die Lipide erscheinen rot bzw. blau gefärbt auf hellem Grund.

- b) Ammoniummolybdat-Perchlorsäure¹³⁰⁾

Zusammensetzung: Ammoniummolybdat 4% 25 ml, 1nHCl 10 ml, Perchlorsäure 72% 5 ml, Aqua dest. 60 ml.

Das Chromatogramm wird nach dem Besprühen 7 Min. bei 85°C getrocknet, anschließend über strömendem Wasserdampf befeuchtet. Unter Einwirkung von UV- oder Sonnenlicht wird der Phosphormolybdänsäure-Komplex bis zur Blaufärbung reduziert.

- c) Ninhydrinfärbung¹³¹⁾

Zusammensetzung: 0.2% Ninhydrin in 95 Teilen n-Butanol und 5 Teilen 2n Essigsäure.

Das Chromatogramm wird mit diesem Reagenz besprüht und 10 Min. auf 105°C erhitzt. Verbindungen mit NH₂-Gruppen ergeben rotviolette Flecken.

3. Quantitative Phosphorbestimmung

Die durch Anfärbemittel lokalisierten Flecken werden ausgeschnitten und gewogen. Nach Zugabe von 0.5 ml einer mit Ammoniummolybdat gesättigten 72%igen Perchlorsäure werden die Flecken in Fiolax-Reagensgläsern verascht. Die Veraschung geschieht in einem Bleiblock über 3 Std. bei 180°C. Den wasserklaren Lösungen wird nach dem Erkalten 5 ml folgenden Gemisches zugegeben:

8 Teile	Perchlorsäure 72%	44.0
	Wasser ad	800.0
1 Teil	Ammoniummolybdat	2.5%
1 Teil	Ascorbinsäure 10%	(frisch bereitet)

Das Gemisch wird im Thermostaten bei 37°C über 2 Std. inkubiert. Der gebildete blaue Komplex wird im Eppendorf-Photometer mit einem Filter Hg 772 und der Photozelle 90 r gemessen (2 ml Küvette). Als Bezugswert dient eine Blindlösung aus den Reagenzien, die den Veraschungsprozeß mitgemacht hat.

Eine Standardlösung mit µg Phosphor/0.5 ml, die aus sek. Kaliumphosphat (Sörensen) hergestellt wird, wird als Testlösung herangezogen.

Die Berechnung des Phosphorgehaltes geschieht nach folgender Formel:

$$P \text{ (}\mu\text{g)} = \frac{(E_c - E_p) \cdot \mu\text{g P der Testlösung}}{E_t}$$

E_c = Extinktion des gemessenen Phosphatidfleckens

E_p = Extinktion eines leeren Papierfleckens

E_t = Extinktion der Testlösung

C. Radioaktive Markierung von Phosphatiden

1. Markierung bei in-vivo Versuchen

Weiblichen Albinoratten von durchschnittlich 180 - 200 g Körpergewicht wird das mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnte, radioaktive $\text{Na}_2\text{HP}^{32}\text{O}_4$ (0.125 mC) subkutan in die Rückenpartie injiziert. Die Tiere werden hierzu in einen leichten Ätherrausch versetzt.

Um Ungenauigkeiten, die durch verschiedenes Alter bedingt sind¹³²⁾, ausschalten zu können, werden für einen Versuch nur Tiere aus demselben Wurf herangezogen. Für eine Versuchsserie werden jeweils 3 Ratten verwendet. Die Inkubationszeit betrug 12 Std.

Das radioaktive sek.Natriumphosphat bezogen wir vom Isotopenlaboratorium Dr.Sauerwein, Düsseldorf, in steriler, isotonischer Lösung. Die Verdünnung nahmen wir mit isotonischer Kochsalzlösung vor, so daß in 1 ml Injektionslösung 1 mC P^{32} enthalten war.

2. Markierung bei in-vitro Versuchen

Bei in-vitro Versuchen wurden ebenfalls weibliche Albinoratten von 180 g Körpergewicht verwendet. Die Tiere wurden durch Ausbluten getötet und die frische Leber entnommen. 10 g des Organs wurde in 0.5 mm große Stücke geschnitten und sofort in Krebs-Hanseleit-Nährlösung¹⁰⁹⁾ gelegt. Der Nährlösung gaben wir zuvor 100 μC $\text{Na}_2\text{HP}^{32}\text{O}_4$ -Lösung zu. Die Weiterverarbeitung des Organs erfolgt nach Lyophylierung wie auf Seite 62 beschrieben.

3. Doppelmarkierung mit ^{32}P -Phosphat und ^{14}C -Glycerin

Einer weiblichen Albinoratte von 180 g Gewicht wird gleichzeitig 0.125 mC isotonische $\text{Na}_2\text{HP}^{32}\text{O}_4$ -Lösung und 0.1 mC ^{14}C -Glycerin subkutan in den Rücken gespritzt. Die Injektion wird in leichter Äthernarkose durchgeführt. Das Tier

bleibt, ohne Nahrung, getrennt von den übrigen Tieren. 24 Std. nach der Injektion wird die Ratte durch Öffnen der Halsschlagader getötet. Die Organe Leber, Lunge, Milz, Herz, Niere und Hirn werden sofort nach Entnahme eingefroren und lyophilisiert. Das weitere Aufarbeiten vollzog sich in Analogie zu der auf Seite 62 beschriebenen Vorschrift.

Das Glycerin- ^{14}C bezogen wir von der Fa. Buchler, Braunschweig, als Glycerol- 1-C^{14} .

T a b e l l e 16

Ergebnisse der Gefriertrocknung und der Atherextraktion

Rattenorgan 180 g Gew.	Naßgew. g	Trockengew. g	Atherextr. mg	Extrakt %
Leber	8.01	2.34	250	10.7
Hirn	1.63	0.38	115	30.2
Lunge	1.55	0.27	30	11.1
Milz	0.93	0.26	28	10.7
Niere	1.61	0.32	21	6.5
Herz	0.98	0.18	14	7.7

Die Angabe "Extrakt" bezieht sich auf die Trockengewichte.

T a b e l l e 17

Ausschnitt aus dem Arbeitsprotokoll zur Ermittlung der spez. Aktivitäten für ^{32}P -Phosphat und ^{14}C -Glycerin. Die Messungen wurden im Tri-carb Spektrometer durchgeführt. Sie beziehen sich auf die Leberphosphatide. Die Meßdauer betrug 5 Minuten je Fleck

Phos- phatid	Imp./ 5 Min.	Imp./ Min.	Rel.A. Z.F.	Ex- tinkt.	$\mu\text{g P}$	S.A. P-32	Imp/M. C-14	Imp. -10% P	S.A. C-14
PC	26687	5337	8325	2.17	7.02	1189	1476	943	134
PÄ	23036	4607	7186	2.97	7.35	981	1462	1002	136
SM	2653	530	826	0.25	1.04	794	-	-	-
CL	1204	240	374	0.28	1.16	322	106	82	70
DPI	170	40	62	0.02	0.08	775	40	36	450
MPI	4661	932	1453	0.52	2.16	672	824	731	338
PS	2861	572	892	0.30	1.24	719	509	452	364
PPTs	822	164	255	0.08	0.33	772	256	240	727

4. Umrechnung auf Gewichtseinheit

Um eine einheitliche Größenordnung für Vergleiche der verschiedenen Organe zu haben, werden die gemessenen Impulse pro Min. auf Imp./Min./g Organ umgerechnet. Aus dem Extraktgewicht, dem Organgewicht und der chromatographierten Lipoidmenge läßt sich ein für jedes Organ spezifischer Faktor ermitteln. Für die Leber beträgt der Faktor $F = 26$.

T a b e l l e 18

Imp./Min./g Organ für die Leberphosphatide

Leber	MPI	DPI	PS	PC	PÄ	CL	SM	PPTs
^{32}P	37778	1612	23192	216450	186836	9724	21476	6630
^{14}C	19006	936	11752	8918	26052	2132	-	6240

5. Verhältnis von P^{32} -Phosphat zu C^{14} -Glycerin

Die ^{32}P -Phosphat- und ^{14}C -Glycerin-Impulse stehen in einem bestimmten Verhältnis. Diese Werte sind in Tabelle 19 unter I eingetragen. Berücksichtigt man jedoch die unterschiedliche Meßausbeute unseres Detektors (^{32}P - 80%, ^{14}C - 40%), so erhält man Zahlen, die sich auf das Verhältnis von ^{32}P zu ^{14}C -Zerfällen beziehen. Diese Zahlen sind in II verzeichnet (Tab. 19).

T a b e l l e 19

Verhältniszahlen von ^{32}P zu ^{14}C -Zerfällen

Imp.		MPI	DPI	TPI	PS	PC	PÄ	CL	PPTs
Leber	I	1.98	1.72	-	1.97	24.27	7.17	4.56	1.06
	II	0.99	0.86	-	0.98	12.13	3.58	2.28	0.53
Hirn	I	1.03	0.36	0.26	0.78	1.54	1.91	0.70	
	II	0.51	0.18	0.13	0.39	0.77	0.96	0.35	
Herz	I	0.35	0.38	-	0.53	2.98	2.64	0.62	
	II	0.17	0.19	-	0.27	1.49	1.32	0.31	
Lunge	I	2.04	3.06	-	2.18	3.96	6.03	1.02	
	II	1.02	1.53	-	1.09	1.98	3.01	0.51	
Milz	I	2.70	2.78	-	1.48	3.26	3.66	1.12	
	II	1.35	1.39	-	0.72	1.63	1.83	0.56	
Niere	I	2.60	2.68	-	1.30	5.19	3.16	1.04	
	II	1.30	1.34	-	0.65	2.59	1.58	0.52	

D. γ -Bestrahlung der Versuchstiere

Zur Bestrahlung der Tiere wurde ein Spezialkäfig aus Plexiglas konstruiert. In einem tortenförmigen Käfig mit einem Durchmesser von 51 cm und einer mittleren Höhe von 5 cm bzw. äußeren Höhe von 7 cm, wurden durch Trennwände 20 Sektoren geschaffen. Die Ratten lagen mit dem Kopf nahe dem Mittelpunkt, so daß ein Umwenden des Körpers ausgeschlossen war. Somit konnte eine für alle Tiere gleiche Bestrahlungsdosis der einzelnen Körperpartien garantiert werden. Die Schichtdicke des Plastikmaterials betrug 0.5 cm; eine Absorption oder Streuung der Strahlen ist somit ausgeschlossen.

Die Strahlenbelastung fand im Institut für Strahlenbiologie^{*)} statt.

Die weiblichen Albinoratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 200 g erhielten aus einer Cobalt-Bombe eine γ -Bestrahlung von 600 r. Die Bestrahlungsdaten waren: Filter 0.6 mm Cu, 1.00 mm Al; Focusabstand 68 cm; Dosisleistung 32.4 r/min; bei 300 kV und 10 mA. Bestrahlungsdauer 18.5 Min. Nach der Bestrahlung blieben die Tiere bei voller Nahrung und Wasser bis zum jeweiligen Zeitpunkt der Injektion. Die Aufarbeitung vollzog sich in Analogie zu der auf Seite 62 beschriebenen Arbeitsvorschrift.

*) Herrn Dr. Müller vom Institut für Strahlenbiologie der Universität München, der lebenswürdiger Weise die Bestrahlung durchführte, danken wir sehr herzlich.

E. Messen der Aktivitäten

1. Geiger-Müller-Zählrohre

Die Geiger-Müller-Rohre MS GM 592/1 und MS GM 565/1 (Telefunken) werden hauptsächlich zum Aufspüren von Aktivitäten und zur Ermittlung der Größenordnung verwendet. Die Rohre werden ohne Gitterschutzkappe direkt auf das Chromatogramm gebracht.

Meßdaten: 450 Volt, Schwelle 2.2; Verstärkung 400;
Totzeit 2×10^{-3} ms; Nullwert 25 Imp./Min.

2. Methandurchflußzähler

Der digitale Strahlungsmeßplatz besteht aus einem Methandurchflußzähler MS MD 632/1, einem automatischen Probenwechsler MS AP 731/1 und einem Zeitdrucker MS ZD 696/2 der Fa. Telefunken. Für die ^{32}P -Messung vom Chromatogramm konnten als ideale Meßwerte ermittelt werden: 2800 Volt, Schwelle 2.2; Verstärkung 400, Totzeit 2×10^{-3} ms.

Nach einer Messung über 10^4 Impulsen, errechnete sich ein Blindwert von 15 Imp./Min.

Die durch Anfärbemittel (Seite 63) sichtbar gemachten Phosphatidflecken werden ausgeschnitten und in Aluminumschälchen in den Probenwechsler eingefahren. Das Meßgut wird 1 Minute mit reinem Methanol vorgespült und anschließend in einer Methanatmosphäre gemessen.

3. Tri-carb Flüssigspektrometer

Mit Nilblau lokalisierte Phosphatidflecke werden in Gefäße aus alkaliarmem Spezialglas von 20 ml Inhalt gebracht. 10 ml einer Szintillatorlösung folgender Zusammensetzung:

5.0 g PPO (2,4 Diphenyloxazol)

0.5 g POPOP (4-methyl-5-Phenyloxazolyl-Benzol)
Toluol p.a. ad 1000.0 g

werden in das Glas gegeben. Die so bereiteten Proben sollen vor Beginn des Meßvorganges 1 - 2 Minuten im geschlossenen 200 Probenwechsler belassen werden, damit die Szintillatoren die vom Tageslicht aufgenommene Energie wieder abgeben können.

Die Proben werden im Tri-carb Flüssigkeitsspektrometer 3000 Series der Fa. Packard, Illinois, gemessen. Das Gerät wird bei 460 Volt betrieben. Der Kanal A mit der Einstellung: 1.8% Gain und 220 - 1000 Discriminatoren, soll die ^{32}P -Impulse anzeigen. Im Kanal B (1.8% Gain, 680 - 1000 Discriminatoren) wird ein eventuell auftretender Quench angezeigt und im Kanal C (20% Gain, 70 - 400 Discr.) werden die ^{14}C -Impulse gemessen. Die effektiven C^{14} -Impulse werden nach einem auf Seite 76 beschriebenen Verfahren berechnet.

4. Ermittlung des Wirkungsgrades

Unter dem Wirkungsgrad wird die Wahrscheinlichkeit verstanden, mit der ein von der zu messenden radioaktiven Substanz ausgehendes Teilchen einen elektrischen Impuls im Detektor auslöst¹³³⁾. Dieser Wirkungsgrad ist in erster Linie von der geometrischen Anordnung des Strahlers zum Detektor abhängig. Da unsere Strahler einheitlich auf Chromatogrammpapier getrennte radioaktive Substanzen sind, läßt sich in einer Versuchsreihe der Wirkungsgrad n für diese Anordnung ermitteln:

$$\text{Wirkungsgrad } n = \frac{\text{gemessene Imp.}}{\text{Zerfälle}}$$

Der reziproke Wirkungsgrad ($\frac{1}{n}$) ist der Faktor, mit dem die gemessenen Impulse multipliziert werden müssen, um Zerfälle zu erhalten.

Auf Formaldehydpapier vom Durchmesser eines Aluminiumschälchens wurde eine Konzentrationsreihe von 0.0001 μC

bis $0.1 \mu\text{C Na}_2\text{HP}^{32}\text{O}_4$ aufgetragen, getrocknet und im Methan-Durchflußzählrohr gemessen (Meßdaten siehe S.70). Tabelle 20 zeigt eine Zusammenstellung der reziproken Wirkungsgrade für ^{32}P -Phosphat auf Formalinpapier im Methandurchflußzähler.

T a b e l l e 20

Reziproke Wirkungsgrade für ^{32}P auf Formaldehydpapier im Methandurchflußzähler

Imp.	1/n	Imp.	1/n	Imp.	1/n
100	2.34	1000	2.39	10 000	2.44
300	2.35	3000	2.40	12 000	2.45
500	2.36	5000	2.41	14 000	2.46
700	2.37	7000	2.42	16 000	2.47
900	2.38	9000	2.43		

5. Aktivitätsausbeuten der Geiger-Müller-Rohre und des Methandurchflußzählers

Zur ständigen Überwachung der Meßgeräte ist es notwendig, vor jeder Messung die Geräte mit Testpräparaten zu eichen. Die Empfindlichkeit der Geräte in den verschiedenen Meßbereichen wird mit verschieden-energetischen Präparaten geprüft.

Wir wählten die Isotope ^{32}P (1.71 MEV), Sr^{90} (0.54 MEV) und ^{14}C (0.158 MEV) und verglichen die mit dem Methandurchflußzähler und den beiden Geiger-Müller-Rohren gezählten Impulse mit den theoretischen Werten.

Tabelle 21 zeigt die prozentuale Ausbeute der genannten Meßgeräte bei verschiedenen Isotopen.

T a b e l l e 21

Vergleich der Aktivitätsausbeuten für Methandurchflußzähler
und Geiger-Müller-Zählrohre

Methandurchflußzähler MS MD 632/1 Telefunken

2800 V, 2.2 Schwelle, 400 Verstärkung, Totzeit 2×10^{-3}

Impulsvorwahl 10^5 Imp.

Geiger-Müller-Zählrohre MS MG 592/1 und MS MG 565/1 Telefunken

450 V, 2.2 Schwelle, 400 Verstärkung, Totzeit 2×10^{-3}

Impulsvorwahl 10^4 Imp.

Präparate MeV	Aktivität	Zerfall	I		%	II		%	III		%
			Imp./Min			Imp./Min			Imp./Min		
P ³²	1.71	0.0369 μ C	81910	24270	29	15429	18	18382	22		
Sr ⁹⁰	0.54	0.045 μ C	99900	19720	19	9965	9	1700	2		
C ¹⁴	0.158	1 nC	2220	335	15	80	3.6	92	4.1		

I = Methandurchflußzähler

II = G-M Zähler 565/1

III = G-M Zähler 592/1

6. ³²P-Anteil im ¹⁴C-Kanal

Reine ³²P-Testpräparate verschiedener Energie werden bei der auf Seite 70 angegebenen Geräteeinstellung im Tri-carb Flüssigspektrometer über 100 Minuten gemessen.

Nimmt man die im ³²P-Kanal gemessenen Impulse als 100% an, so läßt sich der Prozentsatz, der in den ¹⁴C-Kanal fallenden ³²P-Impulse errechnen. Dieser Prozentsatz der ³²P-Impulse wird bei gleichzeitigem Messen der Isotope ³²P und ¹⁴C von dem ¹⁴C-Meßergebnis subtrahiert. Das so erhaltene Ergebnis stellt die effektiven ¹⁴C-Impulse dar.

Tab. 22, S.74, gibt einen Überblick über die gemessenen und errechneten Werte.

T a b e l l e 22

Prozentsatz der im ^{14}C -Kanal gemessenen ^{32}P -Impulse

^{32}P -Kanal Imp./Min.	^{14}C -Kanal Imp./Min.	^{32}P - zu ^{14}C -Kanal Verhältnis in %
375	40	10.66
346	36	10.40
1905	200	10.49
1956	214	10.94
11767	1161	9.86
18571	1747	9.40
22148	2239	10.11

Strahlenquelle: ^{32}P -Testpräparate verschiedener Energie

Meßgerät: Tri-carb Spektrometer der Fa. PACKARD

Geräteeinstellung: ^{32}P -Kanal- 1.8% Gain, 220-1000 Discriminatoren

^{14}C -Kanal- 20% Gain, 70-400 Discriminatoren

7. ^{32}P -Zerfallsreihe

Um aus verschiedenen Versuchen vergleichbare Werte zu erhalten, werden die gemessenen Impulse auf Zerfälle umgerechnet. Da das Isotop ^{32}P eine Halbwertszeit von 14.2 Tagen hat, ist der ^{32}P -Zerfallsfaktor eine stark wechselnde Größe. Die Berechnung erfolgt nach folgender Gleichung:

$$a_t = a_0 \cdot e^{-kt}$$

a_t = Substanz nach der Zeit t

a_0 = Substanz am Tage 0

e = Eulersche Zahl (2.718)

kt = Zerfallskonstante nach gewählter Zeiteinheit

T a b e l l e 23

³²P-Zerfallsreihe

Tag:	0	Faktor:	1.00	Tag:	16	Faktor:	2.21
	1		1.05		17		2.32
	2		1.10		18		2.43
	3		1.16		19		2.56
	4		1.21		20		2.68
	5		1.28		21		2.82
	6		1.34		22		3.03
	7		1.42		23		3.12
	8		1.49		24		3.27
	9		1.56		25		3.45
	10		1.64		26		3.62
	11		1.72		27		3.79
	12		1.81		28		4.00
	13		1.90		29		4.18
	14		2.00		30		4.41
	15		2.09				

8. Berechnung der spezifischen Aktivität

a) ³²P-Phosphat

Die spez.Aktivität wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Aktivität} = \frac{\text{Imp./Min.} \times F}{n}$$

$$\text{Spez.Aktivität} = \frac{\text{Rel.Akt.}}{P}$$

Imp./Min. = gemessene Impulse - Nullwert

F = Zerfallsfaktor von ³²P

1/n = reziproker Wirkungsgrad

P = Phosphorgehalt des Phosphatidfleckens in µg

b) ^{14}C -Glycerin

$$\text{Spez. Aktivität} = \frac{\text{Imp./Min.}}{\text{P}}$$

$$\text{Imp./Min.} = \text{gemessene Glycerin-}^{14}\text{C-Impulse} - \text{Blindwert}$$

P = Phosphorgehalt des entsprechenden Phosphatids
in μg

L I T E R A T U R

- 1) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, J.Gen.Physiol. 44, 61 (1960)
- 2) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, J.Biol.chem. 233, 818 (1958)
- 3) H.BROCKERHOFF u. C.E.BALLOU, J.Biol.chem. 237, 1764 (1962)
- 4) B.BERGSTRÖM, Acta Physiol.Scand. 25, 101 (1952)
- 5) W.TRAPPE, Bioch.Z. 305, 150 (1940)
- 6) C.H.LEA, D.N.RHODES u. R.D.STOLL, Bioch.J. 60, 353 (1955)
- 7) W.TRAPPE, Bioch.Z. 307, 97 (1941)
- 8) J.J.WREN, Chromatogr. 4, 173 (1960)
- 9) G.V.MARINETTI, R.F.WITTER u. E.STOTZ, J.Biol.chem. 226, 475 (1957)
- 10) J.W.DIECKERT u. R.REISER, J.Am.Oil Chem.Soc. 33, 123 (1956)
- 11) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Bioch.Z. 331, 155 (1959)
- 12) J.E.MULDREY, O.N.MILLER u. J.G.HAMILTON, J.Lipid Res. 1, 48 (1959)
- 13) I.A.IZMALOV u. M.S.SHRAIBER, Farmatsija (Mosk) 3, 1 (1938)
- 14) E.STAHL, G.SCHROTER, G.KRAFT u. R.RENZ, Pharmazie 11, 633 (1956)
- 15) R.M.C.DAWSON, Bioch.J. 75, 45 (1960)
- 16) S.FLEISCHER u. H.KLOUWEN, Bioch.Biophys.Res.Comm. 5, 378 (1961)
- 17) N.ZÖLLNER u. D.EBERHAGEN, Unters.u.Best.d.Lipoide im Blut, Springer-Verl.Heidelb. p.222 (1965)
- 18) J.L.CHAIKOFF u. D.B.ZILVERSMIT, Adv.Biol.med.Phys. 1, 322 (1948)
- 19) OSAMU MINARI, Seikagaku (Jap.) 29, 734 (1958)
- 20) OSAMU MINARI, Seikagaku (Jap.) 29, 822 (1958)
- 21) OSAMU MINARI, Seikagaku (Jap.) 29, 818 (1958)
- 22) R.M.C.DAWSON, Bioch.J. 61, 552 (1955)
- 23) G.V.MARINETTI, J.ERBLAND, M.ALBRECHT u. E.STOTZ, Bioch. Bioph.Acta 30, 543 (1958)
- 24) T.SAKAGAWA, J.Biol.(Jap.) 46, 51 (1959)
- 25) H.WIEDEMANN, Dissertation München (1963)
- 26) G.V.MARINETTI, R.F.WITTER u. E.STOTZ, J.Biol.Chem. 226, 475 (1957)
- 27) F.D'AMBRAMO, E.THOMASOS u. G.D.BAGNO, Boll.Soc.ital.Biol. sperim. 31, 414 (1955)
- 28) D.DZIEWIATKOWSKI u. D.BODIAN, J.Cell.Physiol. 35, 141 (1950)
- 29) R.M.C.DAWSON u. D.RICHTER, Proc.Roy.Soc.B. 127, 252 (1950)
- 30) G.B.ANSELL u. S.SPANNER, Nature 185, 826 (1960)
- 31) G.B.ANSELL u. S.SPANNER, J.Neurochem. 4, 325 (1959)
- 32) N.MIANI u. G.BUCCIANTE, Atti.Soc.Med.Chir.Padova 34, 5 (1956)
- 33) H.WAGNER, Ä.LISSAU, J.HÖLZL u. L.HÖRHAMMER, Bioch.Z. 332, 312 (1961)
- 34) A.N.DAVISON u. J.DOBING, Bioch.J. 73, 701 (1959)
- 35) H.J.YBEMA, Pharm.Weekbl. 97, 533 (1962)
- 36) W.E.CORNATZER u. J.H.REITER, Proc.Soc.Exptl.Med. 106, 194 (1961)
- 37) G.B.ANSELL u. S.SPANNER, Bioch.J. 79, 176 (1961)
- 38) R.M.C.DAWSON u. D.RICHTER, Proc.Roy.Soc.(London) 137, 252 (1950)

- 39) B.A.FRIES, H.SCHACHNER u. J.L.CHAIKOFF, J.Biol.Chem. 144, 59 (1942)
- 40) B.A.FRIES, G.W.CHANGUS u. J.L.CHAIKOFF, J.Biol.Chem. 132, 23 (1940)
- 41) E.T.PRITCHARD, Cand.J.Biochem.Physiol. 40, 353 (1962)
- 42) R.H.LAATSCH, J.Neurochem. 9, 487 (1962)
- 43) U.S.KUNTA u. S.GURNANI, J.sci.ind.Res. (New Delhi) 16, 179 (1957)
- 44) D.W.v.BEKKUM, Bioch.Biophys.Acta 25, 487 (1957)
- 45) R.B.MEFFERD jr. u.W.WEBSTER, Rad.Res. 8, 461 (1958)
- 46) S.OHARA, Acta Med.Okayama 16, 333 (1962)
- 47) M.SKALKA, Nature 182, 1602 (1958)
- 48) C.D.JARDETSKY, C.D.BARNUM u. H.VERMUND, J.Biol.Chem. 222, 421 (1956)
- 49) M.SKALKA, Fol.Biol. (Praha) 6, 152 (1960)
- 50) H.WRBA u. E.BOQUOI, Naturwissenschaften 50, 97 (1963)
- 51) E.HECHT u. C.MINCK, Bioch.Biophys.Acta 8, 641 (1952)
- 52) M.H.HACK, Bioch.J. 54, 602 (1953)
- 53) G.V.MARINETTI u. E.STOTZ, J.Am.Chem.Soc. 77, 6668 (1955)
- 54) R.F.WITTER, G.V.MARINETTI, A.MORRISON u. L.HEIKLIN, Arch.Bioch. biophys. 68, 15 (1957)
- 55) Y.JNOUYE u. M.NODA, Arch.Bioch.Biophys. 76, 271 (1958)
- 56) M.D.A.BROWN u. J.W.DIECKERT, Anal.Chem. 29, 30 (1957)
- 57) G.ROUSER, J.O'BRIEN u. D.J.HELLER, Am.Oil Chem.Soc. 38, 14 (1961)
- 58) M.CORMIER, P.JOUAN, L.GIRRE, Bull.soc.chim.biol. 41, 1037 (1959)
- 59) G.V.MARINETTI, J.ERBLAND u. J.KOCHEN, J.Fed.Proc. 16, 837 (1957)
- 60) H.WAGNER, J.HÖLZL, A.LISSAU u. L.HÖRHAMMER, Bioch.Z. 339, 34 (1963)
- 61) F.N.HAYES, R.D.HIEBERT u. R.L.SCHUCH, Science 116, 140 (1952)
- 62) R.D.HIEBERT, u.R.J.WATTS, Nucleonics 11, 38 (1953)
- 63) J.ROUCAYROL, E.OVERHOUSEN u. E.SCHÜSSLER, Nucleonics 15, 104 (1957)
- 64) H.H.SELIGER u. B.AGRANOFF, Anal.Chem. 31, 1605 (1959)
- 65) B.L.FUNT u. A.HETHERINGTON, Science 131, 1608 (1960)
- 66) J.ROCHE, J.NUNEZ u. C.E.JACQUEMIN, Tritium in the Physikal and biological Science, Vol. 2 p.395 (1962)
- 67) J.D.LUGWICK, Anal.Chem. 32, 607 (1960)
- 68) C.H.WANG, Atomlight Nr. 21 (1962)
- 69) V.N.KERR, F.N.HAYES u. D.G.OTT, Int.Ir.Of Applied Rad.and Isotopes 1, 284 (1957)
- 70) C.T.PING, Anal.Chem. 32, 1292 (1960)
- 71) L.A.BAILLIE, Atomlight Nr. 19 (1961)
- 72) L.E.PACKARD, Liquid Scint.Counting, Pergamon Press, London, Oxford, Paris, New York p. 63 (1962)
- 73) C.H.WANG u. D.E.JONES, Bioch.Biophys.Comm.Res. 1, 203 (1959)
- 74) W.F.BOUSQUET u. J.E.CHRISTIAN, Anal.Chem. 32, 722 (1960)
- 75) N.H.HAGE, Bioch.J. 54, 602 (1953)
- 76) G.V.MARINETTI, U.E.STOTZ, J.Am.Chem.Soc. 77, 6668 (1955)
- 77) R.W.R.BACKER u. G.PORCELLATI, Bioch.J. 73, 561 (1959)
- 78) F.SCHLENK in J.B.SUMNER u. K.MYRBÄCK, The Enzyms, Vol. 2, Academic Press, New York p. 302 (1951)

- 79) G.C.BUELL u. R.REISER, J.Biol.Chem. 234, 217 (1959)
- 80) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, J.Biol.Chem. 233, 805 (1958)
- 81) H.ALTMANN u. G.STEHLIK, Atompraxis 471, 8 (1962)
- 82) A.L.v.TAKACH, Dissertation München (1964)
- 83) W.L.NELSON u. C.P.BARNUM, J.Neurochem. 6, 43 (1960)
- 84) A.LISSAU, Dissertation München (1960)
- 85) H.WIEDEMANN, Dissertation München (1963)
- 86) F.BRESCIANI, K.DOSE, Z.Naturforscher 14b, 158 (1959)
- 87) W.SCHRADE, R.BIEGLER u. G.BECKER, Z.Exp.Med. 126, 125 (1955)
- 88) H.WAGNER, A.LISSAU, J.HÜLZL u. L.HÖRHAMMER, Bioch.Z. 335, 312 (1961)
- 89) R.B.ELLIS u. J.N.HAWTHORNE, Bioch.J. 84, 19P (1962)
- 90) H.BROCKERHOFF u. E.C.BALLOU, J.Biol.Chem. 237, 49 (1962)
- 91) R.J.ROSSITER, Mosbacher Kolloquium 1965
- 92) E.P.KENNEDY, Fed.Proc. 20, 834 (1961)
- 93) W.THOMPSON, K.P.STRICKLAND u. R.J.ROSSITER, Bioch.J. 87, 136 (1963)
- 94) R.M.C.DAWSON, Bioch.J. 59, 5 (1955)
- 95) H.H.HILGER, J.D.KLUMPER u. K.J.ULLRICH, Pflügers Arch.ges. physiol. 267, 218 (1958)
- 96) H.SCHIMASSEK, D.KOHL u. T.H.BÜCHER, Bioch.Z. 331, 87 (1959)
- 97) K.J.ULLRICH, Bioch.Z. 331, 98 (1959)
- 98) J.H.HAGEN, The Control of Lipid Metabolism, Academic Press London, New York p. 159 (1963)
- 99) J.P.HEALD, Phosphorus Metabolism of Brain, Pergamon Press Oxford, London, New York, Paris p. 15 (1960)
- 100) G.QUADBECK, Münchner Med.Woschenschr. 1, 24 (1962)
- 101) H.J.YBEMA, Pharmak.Weekbl. 97, 533 (1962)
- 102) G.HAVESY, Radioakt.Indikat.Interscience, New York (1948)
- 103) G.B.ANSELL u. S.SPANNER, Nature 185, 826 (1960)
- 104) G.B.ANSELL, J.N.HAWTHORNE, Phospholipids, Elsevier Publish. Comp., New York p. 180 (1964)
- 105) C.ENTENMAN, J.L.CHAIKOFF u. D.B.ZILVERSMIT, J.Biol.Chem. 15, 166 (1946)
- 106) G.LEONHARDI, J.v.GLASENAPP u. P.KRAUSE, Z.Physiol.Chem. 295, 310 (1953)
- 107) G.B.ANSELL u. J.N.HAWTHORNE, Phospholipids, Elsevier Publish.Comp. New York p. 114 (1964)
- 108) C.ARTOM u. M.A.SWANSON, J.Biol.Chem. 175, 871 (1948)
- 109) H.A.KREBS u. K.HANSELEIT, Hoppe-Seylers 33, 210 (1932)
- 110) H.FRITZ-NIGGLI, Strahlenbiologie, Thieme-Verl.Leipzig p.62 (1959)
- 111) R.GLOCKNER u. S.RÖSINGER, Naturwissensch. 46, 202 (1959)
- 112) H.WRBA u. H.KALB, Naturwissensch. 46, 405 (1959)
- 113) S. GARATTINI u. P.PAOLETTI, Arch.Bioch.Biophys. 80, 210 (1959)
- 114) A.N.DAVISON u. J.DOBHING, Bioch.J. 75, 565 (1960)
- 115) R.C.THOMPSON u. C.E.BALLOU, J.Biol.Chem. 223, 795 (1956)
- 116) E.HAGEMANN, Ratte und Maus, W.D.Gruyter-Verl.Berlin p.4
- 117) G.R.GOULD, V.L.BELL u. E.H.LILLY, Am.J.Physiol. 196, 231 (1959)
- 118) G.R.GOULD u. G.POPJAK, Bioch.J. 66, 51P (1957)
- 119) N.L.R.BUCHER, K.MCGARRAHAN, E.GOULD u. A.V.LOUD, J.biol. chem. 234, 262 (1959)
- 120) S.R.LERNER, W.L.WARNER u. C.ENTENMAN, Fed.Proc. 12, 85 (1953)
- 121) H.WRBA u. E.BOQUOI, Naturwissensch. 50, 97 (1963)

- 122) M.SKALKA, *Experientia* 15, 153 (1959)
- 123) M.SKALKA, *Fol.Biol.(Praha)* 6, 152 (1960)
- 124) R.B.MEFFERD jr. u.W.WEBSTER, *Rad.Res.* 8, 461 (1958)
- 125) H.WIEDEMANN, *Dissertation München* (1963)
- 126) U.S.KUNTA u. S.GURNANI, *J.sci.ind.Res.* 16, 179 (1957)
- 127) H.WAGNER, J.HÖLZL, A.LISSAU u. L.HÖRHAMMER, *Bioch.Z.* 339, 34 (1963)
- 128) G.V.MARINETTI u. E.STOTZ, *J.Am.Chem.Soc.* 77, 6668 (1955)
- 129) M.H.HACK, *Bioch.J.* 54, 602 (1953)
- 130) C.S.HANES, u.F.A.JSCHERWOOD, *Nature* 164, 1107 (1949)
- 131) F.CRAMEER, *Papierchromatographie*, Weinheim/Bergstr. 1954
- 132) M.BÜRGER, *Altern und Krankheit als Problem der Biomorphose*, Thieme-Verl. Leipzig p. 191 (1960)
- 133) K.SCHMEISER, *Radioaktive Isotope* p.51 (1957)

LEBENS LAUF

Am 8.1.1937 wurde ich, Wolfgang Oehler, als Sohn des Apothekers Walter Oehler und seiner Ehefrau Hilde, geb. Fränkle, in Konstanz geboren.

Von 1943 - 1948 besuchte ich die Volksschule in Münzesheim bei Bruchsal und Karlsruhe, von 1948 - 1950 das Humanistische Gymnasium in Karlsruhe und ab 1950 das Gymnasium in Bretten. Dort legte ich 1956 die Reifeprüfung ab.

Die zweijährige Tätigkeit als Apothekerpraktikant leistete ich von 1956 - 1958 in der Stadt-Apotheke in Mosbach/Baden ab. Das anschließende, siebensemestrige Pharmaziestudium an der Technischen Hochschule in Karlsruhe schloß ich im August 1961 mit dem Staatsexamen ab.

Die vorliegende Arbeit begann ich im März 1962 am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer.

